

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MELISA PATRICIA WYLLIE

**CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AO SISTEMA
COMPLEMENTO HUMANO E MICROVESICULAÇÃO EM DIFERENTES CEPAS
DE *TRYPANOSOMA CRUZI***

CURITIBA

2017

MELISA PATRICIA WYLLIE

**CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AO SISTEMA
COMPLEMENTO HUMANO E MICROVESICULAÇÃO EM DIFERENTES CEPAS
DE *TRYPANOSOMA CRUZI***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcel Iván Ramírez Araya

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Wyllie, Melisa Patricia

Caracterização dos mecanismos de resistência ao sistema
complemento humano e microvesiculação em diferentes cepas de
Trypanosoma cruzi. / Melisa Patricia Wyllie. – Curitiba, 2017.
89 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Marcel Iván Ramírez Araya

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia.

1. *Tripanossoma cruzi* I. Título II. Ramírez Araya, Marcel Iván III.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa
de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 574.874

TERMO DE APROVAÇÃO

**“Caracterização dos mecanismos de resistência ao sistema
complemento humano e microvesiculação em diferentes cepas de
Trypanosoma cruzi”**

por

Melisa Patricia Wyllie

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau
de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia
e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:**



Prof. Dr. Marcel Ivan Ramirez Araya - Presidente



Profa. Dra. Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro



Prof. Dr. Gláucio Valdameri

Curitiba, 31 de janeiro de 2017.

Dedico essa dissertação a toda
minha família, especialmente meus pais,
por me apoiar incondicionalmente durante
essa jornada. Obrigada por sempre orar
por mim!

AGRADECIMENTOS

A realização da presente dissertação não seria possível sem importantes apoios de várias pessoas e instituições. Deste modo, agradeço a todos os que sempre me auxiliaram e contribuíram de alguma maneira para que eu conseguisse elaborar e concluir este trabalho. Serei eternamente grata, pois sem vocês não se teria tornado uma realidade.

Agradeço imensamente a Deus por me dar saúde, fortaleza, proteção e sabedoria. Dou graças à Deus também por sempre me carregar quando me faltava força para continuar.

Devo agradecer à Universidade Federal do Paraná e ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia pela oportunidade de realizar o meu mestrado. Aos professores e funcionários do programa obrigada pelo ensinamento, disponibilidade e apoio.

Agradeço, também, à Organização dos Estados Americanos e CAPES pelo apoio financeiro. Ao governo de meu país, São Vicente e as Granadinas, por facilitar minha participação neste programa.

Ao meu orientador, professor Dr. Marcel Iván Ramírez Araya, obrigada pela dedicação, orientando e guiando o desenrolamento do projeto. Acima de tudo, obrigada por estimular o meu interesse pelo conhecimento e pesquisa. Sempre me incentivou a ler mais enriquecendo a minha formação acadêmica.

Quero também estender meus sinceros agradecimentos aos meus colegas de laboratório, grupo Genômica Funcional de Parasitos – Bioquímica – UFPR os quais me apoiaram e auxiliaram durante o desenvolvimento do trabalho. Sou muito grata à minha colega Normanda por compartilhar comigo seu conhecimento e experiência no laboratório. Também ao Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha, chefe deste laboratório, pelas sugestões valiosas que contribuíram de forma significativa para o andamento do projeto.

Gostaria de agradecer aos integrantes do laboratório de Imunoquímica – Patologia Básica – UFPR, que me abriram as portas de seu laboratório para a utilização ilimitada de equipamentos e empréstimo de reagentes facilitando a realização desse trabalho. Muito obrigada pela confiança! Um agradecimento especial à Profa. Dra. Larissa Alvarenga Magalhães por total colaboração nessa

pesquisa pois destinava seu precioso tempo para apoiar o trabalho. Muito obrigada professora por me dar o suporte necessário sempre.

Ao laboratório do Prof. Dr. Sílvio Zanata (laboratório de Neurobiologia – Patologia Básica – UFPR), por gentilmente ceder o uso de sua ultracentrífuga para a execução deste trabalho.

À Dra. Maria Galli de Amorim do laboratório de Genômica Médica – Centro Internacional de Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center (São Paulo) pela atenção e disponibilidade para analisar amostras pelo Nanosight.

À Dra. Iara de Messias-Reason (laboratório de Imunopatologia – Patologia Médica – UFPR) quem gentilmente forneceu as alíquotas de soro humano de pacientes chagásicos.

Desde que comecei o programa de pós, conheci pessoas muito especiais e dispostas a me apoiar. Dentre essas pessoas, agradeço às minhas amigas Regiane, Mariana, Yara e Andressa (as duas!), quem sempre estiveram a meu lado, com todo o apoio, carinho e compreensão. Foi muito bom poder contar com vocês!

O meu profundo e sentido agradecimento aos meus colegas estrangeiros no Brasil; sem dúvida nós formamos um vínculo especial enfrentando dificuldades juntos. Agradeço os momentos de bom convívio e alegria. Quero agradecer especialmente a Lisandro e José por me fazer acreditar que tudo daria certo e por me dar a serenidade e calma necessária nesse tempo; e a Andrés por me auxiliar nos últimos experimentos.

Finalmente, dirijo agradecimentos a todos os meus familiares por sempre me incentivar ao longo destes dois anos. Nunca deixaram de se preocupar comigo. É uma honra fazer parte de uma família que valoriza o trabalho duro e perseverança. Estes valores foram tão importantes para o meu sucesso agora. Vocês com certeza são as pessoas mais importantes na minha vida.

A todos, o meu mais sincero e carinhoso obrigada.

"The more thoroughly I conduct scientific research, the more I believe science excludes atheism. If you think strongly enough you will be forced by science to the belief in God, which is the foundation of all religion."

William Thomson (Lord Kelvin)

RESUMO

O protozoário *Trypanosoma cruzi*, é o agente etiológico da doença de Chagas. Considerada como uma doença tropical negligenciada, esta doença acomete milhões de pessoas do mundo e atinge também mamíferos silvestres e domésticos. Para produzir uma infecção o parasito *T. cruzi* precisa evadir o sistema imune inato do hospedeiro. O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra patógenos; e o sistema complemento representa o principal mecanismo da defesa inata. O sistema complemento é formado por um conjunto de proteínas que são ativadas em cascata e, que culmina na formação de um poro na membrana do patógeno, provocando a sua lise. Todavia, muitos organismos patogênicos como o *T. cruzi* têm desenvolvido vários mecanismos para escapar o ataque do sistema complemento afin de progredir no seu ciclo de vida, e portanto estabelecer a infecção. Recentemente, foi descrito um novo mecanismo de evasão empregado por patógenos, que é a liberação de microvesículas. Microvesículas são estruturas bicamadas lipídicas complexas (0.1-1 μm), oriundo da brotamento e fissão da membrana plasmática e que transportam várias moléculas derivadas das células de origem tais como proteínas e ácidos nucleicos. Nosso grupo de pesquisa recentemente descreveu alguns aspectos das características e papel das microvesículas nos mecanismos de evasão do sistema imune inata e durante os eventos de infecção, utilizando como modelo as microvesículas liberadas durante a interação de apenas uma cepa de *T. cruzi* com células hospedeiras. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo analisar microvesiculação em diferentes cepas de *T. cruzi* durante a interação com células hospedeiras e avaliar seu efeito. Apresentamos evidências de que a liberação de microvesículas é induzida durante a interação entre tripomastigotas metacíclicos de diferentes cepas de *T. cruzi*, G (TcI) e Y (TcII), e células sanguíneas (monócitos) e que existem diferenças na produção de microvesículas entre as diferentes cepas. Os nossos resultados também demonstram o envolvimento das microvesículas isoladas nos mecanismos de resistência de *T. cruzi* à lise mediada pelo complemento e os mecanismos de invasão. A adição de microvesículas a 6,25% de soro humano normal aumentou a resistência dos parasitos da cepa Y à lise mediada por complemento de 50% para 80%; este fenômeno foi mais pronunciado em parasitos da cepa G, pois este aumento quase dobrou. Em termos do papel das microvesículas na infectividade de parasito, verificamos que as microvesículas induziram um aumento de invasão celular pelo parasito. Na presença de microvesículas, o número de parasitos da cepa Y invadindo células mamíferas aumentou por aproximadamente 50%, entretanto mais uma vez este fenômeno foi mais evidente para parasitos da cepa G, o número de parasitos que penetraram as células mamíferas duplicou. Curiosamente, foi observado que o papel das microvesículas na resistência à lise do complemento e na invasão é de classe específica, uma vez que as microvesículas de uma classe não tinha efeito sobre os parasitos de outra classe. Isto indica que as cepas têm mecanismos de inibição independentes e que os componentes de microvesículas poderiam ser diferentes. Finalmente foi comprovado que as microvesículas carregam proteínas parasitárias envolvidas na interação parasito-hospedeiro e que soro de pacientes chagásicos possuem anticorpos que reagem com componentes das microvesículas. Isto fornece evidências de que as microvesículas poderiam ser utilizadas por *T. cruzi* para transferir fatores de virulência a células hospedeiras e do potencial das mesmas como biomarcador para o diagnóstico da doença. Com esse trabalho foi possível demonstrar novos aspectos

da relevância de microvesículas durante a interação de diferentes cepas de *T. cruzi* com células hospedeiras.

Palavras-chave: microvesículas. sistema complemento. invasão.

ABSTRACT

The protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is the etiologic agent of Chagas disease. Considered a neglected tropical disease, this disease affects millions of people worldwide as well as wild and domestic mammals. In order to produce an infection, the *T. cruzi* parasite has to evade the host's innate immune system. The innate immune system is the first line of defense against pathogens; and the complement system represents the main mechanism of innate defense. The complement system is composed of a set of proteins that are activated in cascade, culminating in the formation of a pore in the membrane of the pathogen, resulting in its lysis. However, many pathogenic organisms such as *T. cruzi* have developed several mechanisms to escape the attack of the complement system, in order to progress in their life cycle, and thus establish an infection. Recently, a new evasion mechanism used by pathogens has been described, this is, the release of microvesicles. Microvesicles are complex lipid bilayer structures (0.1-1 μm), originating from the outward blebbing and fission of plasma membrane, and which carries molecules derived from the parent cell such as proteins and nucleic acids. Our research group recently described some aspects of the characteristics and role of microvesicles as a mechanism of evasion of the innate immune system and during the infection process, using as model, the microvesicles released during the interaction of only one strain of *T. cruzi* with host cells. Accordingly, the objective of the present work was to analyse microvesiculation during interaction of different *T. cruzi* strains with host cells and to evaluate their effect. We present evidence that microvesicle release is induced during the interaction between metacyclic trypomastigotes from different *T. cruzi* strains, G (TcI) and Y (TcII), and blood cells (monocytes). Our results also demonstrate the involvement of microvesicles, isolated from *T. cruzi* and host cells interaction, in parasite resistance to complement-mediated lysis and invasion mechanisms. Addition of microvesicles to 6,25% normal human serum increased parasite resistance to complement-mediated lysis from 50% to 80% in parasites of Y strain; this inhibition was more pronounced in G parasites since this increase was almost doubled. In terms of the role of microvesicles in parasite infectivity, we verified that the microvesicles induced an increase in cellular invasion by the parasite. In the presence of microvesicles, the number of parasites of the Y strain invading mammalian cells increased by approximately 50%, however once again this phenomenon was more evident for parasites of G strain, the number of parasites that penetrated the mammalian cells duplicated. Interestingly, it was observed that the role of microvesicles in resistance to complement lysis and invasion is class-specific, since microvesicles of one class had no effect on the parasites of the other class. This indicates that the strains have independent inhibition mechanisms and that the components of microvesicles could be different. Lastly, it was demonstrated that microvesicles carry parasite proteins involved in the parasite-host cell interaction and that sera from chagasic patients contain antibodies that react with microvesicular components. This provides evidence that microvesicles could be used by *T. cruzi* to transfer virulence factors to host cells and their potential application as a biomarker for the diagnosis of this disease. With this work, it was possible to demonstrate new aspects of the relevance of microvesicles released during the interaction of different *T. cruzi* strains with host cells.

Key words: microvesicles. complement system. invasion.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CICLO DE VIDA DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
FIGURA 2 – ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO	23
FIGURA 3 – FAIXAS DE TAMANHO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES	28
FIGURA 4 – MVS DA INTERAÇÃO DE <i>Trypanosoma cruzi</i> E AS CÉLULAS HOSPEDEIRAS	34
FIGURA 5 – MVS DERIVADAS DA INTERAÇÃO DE DIFERENTES CEPAS E CLONES DE <i>Trypanosoma cruzi</i> E CÉLULAS THP-1	50
FIGURA 6 – DIFERENÇAS NA PRODUÇÃO DE MVS DERIVADAS DA INTERAÇÃO DAS CEPAS G E Y E AS CÉLULAS THP-1	51
FIGURA 7 – APRESENTAÇÃO GRÁFICA E NÚMERICA DA ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DE MVS	52
FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ANÁLISE DE MVS PELO RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS	54
FIGURA 9 – ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE DA SUBUNIDADE II DA CITOCROMO OXIDASE (COII) DAS CEPAS G E Y.....	56
FIGURA 10 – ENSAIOS DE LISE PELO COMPLEMENTO POR DILUIÇÃO SERIADA DE SORO HUMANO NORMAL	57
FIGURA 11 – <i>WESTERN BLOT</i> : REATIVIDADE DE SORO HUMANO COM EXTRATO TOTAL DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	59
FIGURA 12 – ENSAIOS DA LISE MEDIADA PELO COMPLEMENTO NA PRESENÇA DE MVS.....	60
FIGURA 13 – ENSAIOS DA LISE MEDIADA PELO COMPLEMENTO UTILIZANDO DIFERENTES QUANTIDADES DE MVS.....	61
FIGURA 14 – ENSAIOS DA LISE MEDIADA PELO COMPLEMENTO: EFEITO DAS MVS SOBRE AS DIFERENTES VIAS DO SISTEMA COMPLEMENTO	62
FIGURA 15 – ENSAIOS DA LISE MEDIADA PELO COMPLEMENTO: EFEITO DAS MVS DE UMA CEPA SOBRE OS PARASITOS DE OUTRA CEPA	62
FIGURA 16 – ENSAIOS DE INVASÃO: O PAPEL DE MVS NA TAXA DE INVASÃO.....	64
FIGURA 17 – <i>WESTERN BLOT</i> : AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS A MVS	65
FIGURA 18 – PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR MACRÓFAGOS (CÉLULAS THP-1 DIFERENCIADAS)	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SOLUÇÕES UTILIZADAS E SUAS COMPOSIÇÕES	37
TABELA 2 - CLASSIFICAÇÃO DAS CEPAS DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

Ca ²⁺	- Íon de cálcio
CaCl ₂	- Cloreto de cálcio
CO ₂	- Dióxido de carbono
DEAE	- Dietilaminoetil
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DTT	- do inglês, <i>Dithiothreitol</i>
DTU	- Unidade de Tipagem Discreta (do inglês, <i>Discrete Typing Unit</i>)
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	- Ácido etileno glicol tetra-acético
EUA	- Estados Unidos de América
FITC	- Isotiocianato de fluoresceína
KCl	- Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	- Fosfato monobásico de potássio
HCl	- Ácido clorídrico
IFN-γ	- Interferon-gama
IL-1β	- Interleucina-1β
IL-6	- Interleucina-6
IL-10	- Interleucina-10
LIT	- Meio de cultivo com Infuso de fígado e triptose (do inglês, <i>Liver Infusion Tryptose</i>)
MCP-1/CCL2	- Proteína quimioatratante de monócitos-1 (do inglês, <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>)
Mg ²⁺	- Íon de magnésio
Na ₂ EDTA	- Sal di-sódico de EDTA
NaHCO ₃	- Bicarbonato de sódio
Na ₂ HPO ₄	- Fosfato de sódio dibásico
NaOH	- Hidróxido de sódio
PBS	- Tampão fosfato-salino (do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	- Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PMA	- 12-miristato 13-acetato de forbol

RPMI	- do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
TGF- β	- Fator de transformação do crescimento- β (do inglês, <i>Transforming Growth Factor-β</i>)
TNF- α	- Fator de necrose tumoral- α (do inglês, <i>Tumour Necrosis Factor-α</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	A DOENÇA DE CHAGAS E O PARASITO <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
2.1.1	Evolução clínica e tratamento da doença de Chagas	14
2.1.2	Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
2.1.3	Variabilidade entre as cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
2.1.4	Proteínas de superfície envolvidas na interação parasito-hospedeiro	19
2.2	IMUNIDADE INATA E O SISTEMA COMPLEMENTO	20
2.2.1	Aspectos gerais do sistema complemento	21
2.3	O SISTEMA COMPLEMENTO E <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
2.3.1	<i>Trypanosoma cruzi</i> é morto pelo sistema complemento	24
2.3.2	Mecanismos de evasão à ação do sistema complemento pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
2.4	AS MICROVESÍCULAS	27
2.4.1	O papel das microvesículas na infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
3	OBJETIVOS (GERAL E ESPECÍFICOS)	36
3.1	OBJETIVO GERAL	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	MEIOS DE CULTURA	37
4.2	SOLUÇÕES	37
4.3	CULTURA DE CÉLULAS	38
4.4	DIFERENCIAÇÃO DE EPIMASTIGOTA PARA TRIPOMASTIGOTA METACÍCLICO (METACICLOGÊNESE)	39
4.5	PURIFICAÇÃO DAS FORMAS METACÍCLICAS DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
4.6	SORO HUMANO NORMAL	39
4.7	SORO HUMANO DE PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS	40
4.8	INDUÇÃO DE MICROVESÍCULAS DA INTERAÇÃO <i>Trypanosoma cruzi</i> E CÉLULAS THP-1 E ANÁLISE	40
4.8.1	Determinação da concentração de proteína em MVs	41
4.8.2	Análise de MVs por citometria de fluxo	41
4.8.3	Análise de MVs por Nanosight	41

4.9	GENOTIPAGEM DAS CEPAS DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	42
4.9.1	Coloração com prata	42
4.10	LISE MEDIADA PELO COMPLEMENTO	43
4.10.1	Ativação das diferentes vias do sistema complemento	43
4.10.2	Efeito das microvesículas na resistência a lise mediada pelo complemento	44
4.11	ENSAIOS DE INVASÃO A CÉLULAS VERO	44
4.11.1	Ensaio de invasão usando o sistema de Transwell® (liberação simultânea de microvesículas e invasão celular)	44
4.11.2	Ensaio de invasão com MVs purificadas	45
4.12	ENSAIOS DE WESTERN BLOT.....	45
4.12.1	Obtenção de extrato proteico total de tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	45
4.12.2	Obtenção de extrato proteico total de células Vero	45
4.12.3	Preparação das MVs para eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).....	46
4.12.4	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	46
4.12.5	Western blot	47
4.13	ENSAIOS DE ELISA (IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA): MEDIÇÃO DE CITOCINAS	48
4.13.1	Diferenciação das células THP-1 em macrófagos	48
4.13.2	Obtenção do extrato proteico total de tripomastigotas metacíclicos	48
4.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5	RESULTADOS	50
5.1	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS MVS DERIVADAS DA INTERAÇÃO DE DIFERENTES CEPAS DE <i>Trypanosoma cruzi</i> COM CÉLULAS THP-1	50
5.1.1	Análise de MVs pelo citometria de fluxo	52
5.1.2	Análise de MVs pelo rastreamento de nanopartículas (Nanosight)	54
5.1.3	Genotipagem das cepas G e Y: Análise de polimorfismo do gene citocromo oxidase	55
5.2	AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DAS MICROVESÍCULAS NA LISE MEDIADA PELO SISTEMA COMPLEMENTO	56
5.2.1	Análise do efeito de MVs, isoladas da interação <i>Trypanosoma cruzi</i> -células mamíferas, sobre a atividade do sistema complemento.....	60

5.3	DETERMINAÇÃO DO EFEITO DAS MICROVESÍCULAS NO PROCESSO DE INVASÃO DE FORMAS METACÍCLICAS DE <i>Trypanosoma cruzi</i> NAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS	63
5.4	DETERMINAÇÃO DOS COMPONENTES DAS MICROVESÍCULAS QUE PODERIAM SER ANTIGÊNICOS CONTRA SORO DE PACIENTES CHAGÁSICOS E AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE GP82 EM MICROVESÍCULAS LIBERADAS DURANTE A INTERAÇÃO PARASITO-CÉLULA HOSPEDEIRA	65
5.5	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DAS MVS NA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM MACRÓFAGOS (CÉLULAS THP-1 DIFERENCIADAS)	67
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÕES	76
8	PERSPECTIVAS	77
	REFERÊNCIAS.....	78
	ANEXO A – APROVAÇÃO DE COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DO SORO HUMANO	88
	ANEXO B – TRABALHO SUBMETIDO	89

1 INTRODUÇÃO

Um dos problemas de saúde mais significativos no continente latino-americano em termos de impacto socioeconômico e a saúde humana, e recentemente considerado uma ameaça emergente para países não endêmicos como EUA e Europa, é a doença de Chagas. Esta parasitose é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e afeta cerca de 7 milhões de pessoas na América Latina e mais um quarto de milhão em países não endêmicos (BONNEY, 2014; WHO, 2016). Atualmente, a doença de Chagas é classificada como uma parasitose tropical negligenciada pela Organização Mundial da Saúde. Estima-se que esta enfermidade representa um custo global de mais de US\$ 7 bilhões ao ano, incluindo custos com o tratamento da doença, perdas de produtividade por absenteísmo e o controle vetorial (LEE *et al.*, 2013). Vale destacar que o Brasil segue no topo do *ranking* mundial em termos de perdas de produtividade (mais de US\$ 1 bilhão ao ano) e despesas com a assistência médica (US\$ 129 milhões por ano) (LEE *et al.*, 2013). Essas cifras enfatizam a necessidade de pesquisa contínua para ampliar os conhecimentos relativo ao agente etiológico da doença, *T. cruzi*, já que isso pode ter um profundo impacto no tratamento, prevenção e controle da doença.

T. cruzi possui um ciclo de vida complexo entre um hospedeiro vertebrado (mamífero) e um hospedeiro invertebrado (inseto), sofrendo alterações morfológicas e bioquímicas no processo. Devido ao seu ciclo de vida parasitária intracelular obrigatória, *T. cruzi* tem desenvolvido vários mecanismos para evadir a ação do sistema imunológico do hospedeiro. O estudo dessas estratégias de evasão pode fornecer informações importantes para o entendimento do curso da doença e dos mecanismos que o parasito utiliza para infectar as células hospedeiras. Além disso, este conhecimento pode contribuir para a procura de alvos para o desenvolvimento de vacinas e novos tratamentos.

Nesta perspectiva, propomos estudar um dos mecanismos empregado pelo parasito para subverter o sistema imunológico do hospedeiro, isto é a liberação de microvesículas, focando na sua participação na inibição ao complemento e a sua participação nos mecanismos de invasão celular do parasito. A proposta do trabalho é comparar o processo de microvesiculação em diferentes cepas de *T. cruzi*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A DOENÇA DE CHAGAS E O PARASITO *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas foi descrita pela primeira vez em 1909, pelo médico e cientista brasileiro Carlos Chagas (CHAGAS, 1909). Também conhecida como tripanossomíase americana, a doença de Chagas é uma infecção parasitária causada por *T. cruzi*, um protozoário hemoflagelado intracelular obrigatório da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae.

Esta doença é considerada endêmica em 21 países da América Latina; no entanto, nas últimas décadas, tem sido cada vez mais detectada em EUA, Canadá, Europa, Austrália e Japão (BONNEY, 2014; Organização Mundial da Saúde, WHO, 2016). Isto é principalmente devido ao fluxo migratório entre América Latina e o resto do mundo. Atualmente, esta doença acomete mais de 7 milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2016). Além disso, estima-se que cerca de 65 milhões de pessoas nas Américas se encontram em áreas suscetíveis a infecção. Calcula-se que há cerca de 28.000 novos casos anuais e 12.000 mortes em todas as regiões endêmicas (Organização Panamericana de Saúde, PAHO 2014). No Brasil, estima-se que entre 2 a 3 milhões de pessoas estão infectadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

O modo de transmissão natural da doença é a vetorial, principalmente através dos insetos-vetor hematófagos da família Reduviidae (subfamília Triatominae), sendo *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata*, entre as vetores mais importantes da doença (RASSI *et al.*, 2010). Embora existam outros modos de infecção tais como via congênita; transfusões sanguíneas ou transplante de órgãos; acidentes laboratoriais (seja na manipulação do inseto infectado ou do próprio parasito) e a via oral (ingestão de alimentos contaminados pelos insetos infectos ou pelas fezes destes).

2.1.1 Evolução clínica e tratamento da doença de Chagas

Durante o curso clínico da doença de Chagas, pode ser observada inicialmente a fase aguda, podendo ser sintomática ou assintomática (de acordo com o estado imunológico do hospedeiro). Quando aparente (isto é no caso de 10-30% dos pacientes), os sinais clínicos aparecem entre 5 a 40 dias após transmissão

e os pacientes apresentam uma sintomatologia variável como febre, dores musculares e reação inflamatória no local da picada do inseto (chagoma) (RASSI *et al.*, 2010; BONNEY, 2014; WHO, 2016). A mortalidade na fase aguda pode chegar a até 10% dos indivíduos sintomáticos (RASSI *et al.*, 2010; BONNEY, 2014). Outra característica dessa fase, é que devido ao alto grau de multiplicação dos parasitos, a parasitemia chega a ser suficiente alta que as formas sanguíneas do parasito podem ser facilmente detectadas no sangue através do exame microscópico do mesmo (BONNEY, 2014).

Após a fase aguda, os hospedeiros entram na fase crônica da doença; essa fase caracteriza por um longo período assintomático que pode variar entre 10 e 30 anos ou durante toda sua vida. Cerca de 60-70% dos indivíduos infectados permanecem na fase crônica indeterminada, sem manifestações clínicas da doença. Enquanto 30-40% dos pacientes, com o decorrer do tempo, evoluirão para a fase crônica determinada, apresentando quadros clínicos que incluem distúrbios cardíacos (megacárdio) e digestivos (megaesôfago e megacólon), nem sempre estando relacionado com a presença do parasito, que é extremamente difícil de ser detectado na fase crônica (RASSI *et al.*, 2010; BONNEY, 2014; WHO, 2016).

Como ainda não há vacina contra doença de Chagas, o controle do inseto vetor, a triagem das amostras de sangue antes de transfusões e transplantes e o tratamento dos pacientes infectados são as ferramentas atualmente disponíveis para controlar esta doença. Por mais de 40 anos, a quimioterapia da doença de Chagas se restringe a apenas dois fármacos, Benzonidazol e Nifurtimox (PAES *et al.*, 2011; BERMUDEZ *et al.*, 2016). Estas drogas têm mostrado um grau de eficácia no tratamento da doença; apresentam uma eficácia acima de 60% na fase aguda e de 10-20% na fase crônica sintomática (PAES *et al.*, 2011; BONNEY, 2014). É importante mencionar que estas drogas apenas matam os parasitos extracelulares (BELLINI *et al.*, 2012), por isso é mais eficaz na fase aguda, curando aproximadamente 60% dos casos (quando for diagnosticado) (BONNEY, 2014). Além disso, o tratamento provoca efeitos colaterais indesejáveis como reações alérgicas, vômitos e náuseas, e existe uma sensibilidade variável a essas drogas dentre as diferentes cepas de *T. cruzi* (BERMUDEZ *et al.*, 2016). Cabe salientar que o impacto econômico causado pela doença é grande, visto que o custo do tratamento continua a ser substancial e um número grande de pessoas em idade produtiva morre prematuramente. Essas inconveniências destacam a necessidade de

contínuo estudo, assim como entender os mecanismos básicos de patogenicidade parasitária e os mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao parasito.

2.1.2 *Ciclo biológico de Trypanosoma cruzi*

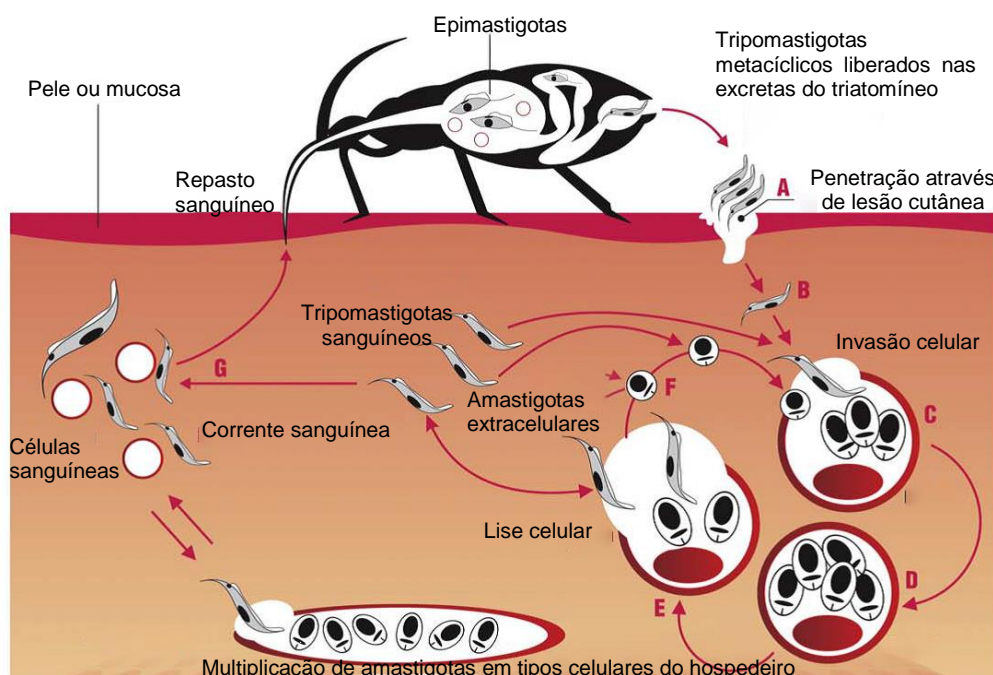
Ao longo de seu ciclo biológico heteroxênico, *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas: amastigota, epimastigota e tripomastigota, alternando entre hospedeiros invertebrados ou o inseto-vetor, e hospedeiros vertebrados, como marsupiais e mamíferos placentários, inclusive o homem. Os tripomastigotas metacíclicos são liberados nas fezes ou urina do vetor triatomíneos após o repasto sanguíneo. Estas formas infectam o hospedeiro mamífero pela membrana mucosa ou pelas regiões descontínuas no epitélio (comumente lesão cutânea devido ao prurido intenso no local da picada) (PAES *et al.*, 2011). Uma vez dentro do hospedeiro, o parasito invade rapidamente uma grande variedade de células nucleadas de mamíferos. Contudo, Coimbra e colaboradores (2007) demonstraram a capacidade de *T. cruzi* para invadir células enucleadas, isto é, células em onde o núcleo foi removido experimentalmente (COIMBRA *et al.*, 2007).

O momento da invasão coincide com a formação de um compartimento endocítico com membrana revestida de lisossomos, o vacúolo parasitóforo. Há acidificação do meio (pelos lisossomos), o que ativa mecanismos parasitários como a secreção de fatores líticos levando à ruptura do vacúolo e subsequentemente à fuga do parasito ao citoplasma (ANDREWS *et al.*, 1990; ALBERTTI *et al.*, 2010). No citoplasma, os tripomastigotas metacíclicos se diferenciam para a forma amastigota. As amastigotas se multiplicam por divisão binária e se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos.

Eventualmente, as células hospedeiras infectadas se rompem e como a lise celular pode ocorrer antes da diferenciação total, amastigotas e tripomastigotas sanguíneos são liberadas. Essas formas evolutivas de *T. cruzi* passam a circular pelo organismo, invadindo novas células ou entrar na corrente sanguínea. Ambas formas podem ser ingeridas pelo inseto vetor durante a hematofagia, porém no intestino do inseto, somente os tripomastigotas sanguíneos se diferenciam na forma replicativa extracelular denominada epimastigotas. Os epimastigotas se replicam e se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas que vão reiniciar o ciclo

(FIGURA 1) (ARGOLO *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2010; RASSI *et al.*, 2010; WHO, 2016).

FIGURA 1 – CICLO DE VIDA DE *Trypanosoma cruzi*



FONTE: Adaptado de LIMA *et al.* (2010).

NOTA: As formas epimastigotas presentes no intestino do triatomíneo diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos, que são liberados nas excretas durante o repasto sanguíneo. (a,b) Os metacíclicos entram no hospedeiro através de lesões cutâneas ou superfícies mucosas, (c) invadem diferentes tipos celulares do mamífero, sendo internalizados em vacúolos parasitóforos onde permanece por algumas horas. (d) Logo depois os tripomastigotas saem do vacúolo ao citoplasma e diferenciam-se em amastigotas, os quais sofrem sucessivas divisões binárias. (e) Os amastigotas se transformam em tripomastigotas sanguíneos, os quais são liberados após a lise celular; (f) podem infectar células vizinhas ou (g) percorrer a corrente sanguínea onde podem ser infectar novos insetos triatomíneos infectando outros tecidos e sustentar assim o ciclo.

2.1.3 Variabilidade entre as cepas de *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi é considerado uma espécie heterogênea consistindo de várias subpopulações, que apresentam cepas que circulam em hospedeiros mamíferos domésticos e selvagens, e insetos vetores (ZINGALES *et al.*, 2009). O parasito exibe um alto grau de variabilidade genética como foi revelado através de diferentes análises incluindo: perfis eletroforéticos de isoenzimas (MILES *et al.*, 1977), polimorfismo de DNA (STEINDEL *et al.*, 1993) e variabilidade de sequências de RNA ribossomal (SOUTO e ZINGALES, 1993).

Inicialmente, *T. cruzi* foi classificado em três grupos distintos, denominados de zimodemas Z1, Z2 e Z3, baseado na análise dos isoenzimas por Miles e colaboradores (MILES *et al.*, 1977). No entanto, com o advento da biologia molecular, diversas análises moleculares foram realizadas e foram propostas outras classificações. Em 1999, durante o Simpósio Internacional Comemorativo da Descoberta da Doença de Chagas, a fim de padronizar a nomenclatura e harmonizar os grupos definidos por isoenzimas e os marcadores genéticos, foi adotada a classificação das cepas de *T. cruzi* em duas linhagens principais, denominadas TcI e TcII (ANONYMOUS, 1999). Recentemente, em 2009 considerando os avanços nos estudos genéticos das duas linhagens, esta nomenclatura foi revisada e as cepas de *T. cruzi* foram agrupadas em seis unidades distintas (DTUs) TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI (ZINGALES *et al.*, 2009; ZINGALES *et al.*, 2012). O termo DTU se refere a um conjunto de isolados geneticamente semelhantes que pode ser identificado por marcadores moleculares e imunológicos comuns (ZINGALES *et al.*, 2009; BERMUDEZ *et al.*, 2016).

Embora seja evidente a diversidade entre as cepas de *T. cruzi*, até agora nenhuma associação específica entre manifestações clínicas particulares da doença e uma determinada linhagem tem sido claramente comprovada (ZINGALES *et al.*, 2012; RAGONE *et al.*, 2015). Contudo, de modo geral sabe-se o seguinte:

a. TcI é a linhagem com maior distribuição na América e pode ser encontrado em diversos hospedeiros selvagens e domésticos de América do Norte até América do Sul. A infecção humana com TcI parece ser predominante na região norte da América do Sul e América Central (ZINGALES *et al.*, 2012). Porém casos esporádicos no sul do Brasil principalmente associados à infecção oral têm sido documentados (BARBOSA *et al.*, 2006). Ademais, essa DTU tem sido frequentemente associada à alta parasitemia durante a fase aguda da infecção com manifestações clínicas graves (BARBOSA *et al.*, 2006; COURA, 2006).

b. TcII, TcV e TcVI prevalecem nas regiões sul e centrais da América do Sul e estão envolvidas em infecções humanas, associadas a manifestações graves da fase crônica tais como megacárdio, megacólon e megaesôfago (ZINGALES *et al.*, 2012).

c. TcIII e TcIV ocorrem comunmente em hospedeiros selvagens na América do Sul, embora casos raros de infecção humana têm sido documentados (ZINGALES *et al.*, 2012).

2.1.4 Proteínas de superfície envolvidas na interação parasito-hospedeiro

T. cruzi conta com um número de proteínas de superfície para poder aderir e invadir as células de mamíferos. Ao longo dos anos, vários grupos de pesquisa têm identificado moléculas de superfície de *T. cruzi* envolvidas no processo de invasão (RAMIREZ *et al.*, 1993; PEREIRA-CHIOCCOLA *et al.*, 2000; CUEVAS *et al.*, 2003; ATAYDE *et al.*, 2004). Recentemente estudos genômicos e proteômicos têm contribuído para ampliar o conhecimento dessas moléculas. A análise do genoma de *T. cruzi* constatou que o parasito exibe uma expansão grande de famílias multigênicas que codificam para proteínas de superfície; as mais representativas são as trans-sialidases, proteínas de superfície associadas à mucina (MASPs), mucinas e glicoproteínas gp63 (em conjunto correspondem a aproximadamente 18% do total de genes codificadores de proteínas) (EL-SAYED *et al.*, 2005). Por outro lado, a análise proteômica revelou proteínas de superfície do parasito que são diferencialmente expressas ao longo do ciclo de vida (ATWOOD *et al.*, 2005).

A super família de trans-sialidases compreende um grupo de glicoproteínas ancoradas na membrana por GPI (glicosilfosfatidilinositol). Possuem atividade enzimática; atua removendo resíduos de ácido sálico do hospedeiro transferindo-os para proteínas de superfície (mucinas) do parasito. A sialilação parece conferir proteção ao parasito contra a ação do sistema imune, principalmente em formas tripomastigotas (PEREIRA-CHIOCCOLA *et al.*, 2000). As trans-sialidases também estão envolvidas no escape do parasito do vacúolo parasitóforo para o citoplasma (ALBERTTI *et al.*, 2010) e a ligação a receptores de membrana da célula hospedeira estabilizando assim a interação parasito-hospedeiro (DE PABLOS e OSUNA, 2012). Um exemplo da família trans-sialidase bem estudado é a glicoproteína 82 ou gp82 (~82 kDa). Esta proteína, que é expressa somente nas formas metacíclicas, é capaz de ligar a moléculas (desconhecidas) na membrana da célula hospedeira, disparando a mobilização de Ca^{2+} tanto nas células hospedeiras quanto nos próprios parasitos, um evento necessário para a internalização do parasito (RAMIREZ *et al.*, 1993; ATAYDE *et al.*, 2004; YOSHIDA, 2006).

As mucinas, glicoproteínas ancoradas com GPI, são as proteínas de superfície mais abundantes de *T. cruzi*. Estão envolvidas em processos de proteção do parasito contra os mecanismos de defesa do vetor e do hospedeiro e promovem a adesão e invasão das células de mamíferos (BUSCAGLIA *et al.*, 2006).

As MASPs constituem outra família de proteínas de superfície de *T. cruzi* ancoradas com GPI. São diferencialmente expressas nas formas tripomastigotas. Esta família é altamente polimórfica e acredita-se que pode estar relacionada a capacidade do parasito para evadir a ação do sistema imune do hospedeiro (EL-SAYED *et al.*, 2005; BARTHOLOMEU *et al.*, 2009; DE PABLOS e OSUNA, 2012).

Gp63 é uma família de glicoproteínas (~63 kDa) que apresenta atividade de metaloprotease dependente de zinco. São expressas em todos os estágios do ciclo de vida do parasito; alguns membros são ancorados na superfície pela âncora de GPI, enquanto outros são inseridos na membrana plasmática através de domínios transmembrana. Há evidência de que gp63 tem um papel na invasão das células do hospedeiro por *T. cruzi*, pois anticorpos contra gp63 bloquearam parcialmente a invasão de células hospedeiras por tripomastigotas (CUEVAS *et al.*, 2003; KULKARNI *et al.*, 2009).

Concluindo, estas proteínas de superfície viram alvos do sistema imune do mamífero após a infecção, desencadeando uma resposta imunológica. Na seguinte seção, será apresentado o papel do sistema imune inato para controlar os níveis parasitários, dando ênfase no sistema complemento.

2.2 IMUNIDADE INATA E O SISTEMA COMPLEMENTO

Uma vez dentro do hospedeiro, *T. cruzi* necessita evadir a resposta imune inata do hospedeiro mamífero e invadir as células rapidamente para progredir na infecção. Igualmente, após os primeiros ciclos de replicação intracelular e a ruptura da célula hospedeira, *T. cruzi* atinge a corrente sanguínea de mamíferos e torna-se um alvo do sistema imune.

Durante os primeiros momentos da infecção, os mecanismos mais relevantes do sistema imune seriam a imunidade inata humoral (sistema complemento) e a celular (por exemplo células NK ou *natural killer* e macrófagos). Ao detectar a presença de patógenos, estas células liberam moléculas denominadas citocinas; as citocinas são fundamentais para induzir os mecanismos tripanocídicos contra *T. cruzi* e ativar a resposta imune adaptativa (CARRERA-SILVA *et al.*, 2011). Dentre as citocinas detectadas em concentrações elevadas durante a infecção por *T. cruzi*, incluem IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , IL-6, TGF- β e MCP-1/CCL2 (ROMAN-CAMPOS *et al.*, 2009). Curiosamente, estudos têm mostrado que estas citocinas têm efeitos

diferentes durante a infecção por *T. cruzi*. O tratamento de macrófagos infectados por *T. cruzi*, com IFN- γ e TNF- α aumentou a eficiência dos macrófagos para matar os amastigotas, enquanto a adição de TGF- β ou IL-10 inibiu a atividade tripanocídica dos macrófagos (ABRAHAMSOHN, 1998).

2.2.1 Aspectos gerais do sistema complemento

O sistema complemento é o principal mecanismo de defesa inata humoral dos vertebrados contra microorganismos invasores (MAYILYAN *et al.*, 2008). O sistema complemento de mamíferos está bem caracterizado e tal sistema é composto por mais de 40 proteínas: um conjunto de proteínas solúveis (produzidas principalmente no fígado) e proteínas da membrana plasmática (geralmente servem como receptores e reguladores). As proteínas do sistema complemento, presentes no soro, nos tecidos, na superfície celular e dentro de células, estão na maior parte na forma inativa porém na presença de um estímulo são ativadas em cascata e resultam na formação de um poro na membrana do patógenos como *T. cruzi*, provocando a lise.

O sistema complemento pode ser ativado por meio de três vias (FIGURA 2) (WALPORT, 2001; CESTARI *et al.*, 2013; EVANS-OSSES *et al.*, 2013; MERLE *et al.*, 2015a, 2015b).

a. **A via clássica**, que é geralmente ativada quando imunoglobulinas IgG/IgM ligam à superfície de um patógeno e o complexo C1 do complemento se associa com o imunocomplexo. O C1 está constituído pelas moléculas C1q, C1r e C1s, uma formação dependente de Ca^{2+} . A C1q liga à região Fc dos anticorpos na superfície do patógeno, a molécula C1r sofre uma alteração conformacional tornando-se ativa. A C1r cliva C1s ativando-a, e a molécula C1s cliva C2 e C4 para a formação de C3 convertase (C4b2a). C1r e C1s são serino proteases. Vale mencionar que a molécula C1q é capaz de ligar a mais de 100 outras moléculas incluindo padrões moleculares associados a patógenos como lipopolissacarídeos; dessa maneira a via clássica pode ser ativada de uma maneira independente do complexo anticorpo-antígeno (MERLE *et al.*, 2015a).

b. **A via das lectinas**, que é ativada mediante a ligação de lectinas MBL (*Mannan-Binding Lectin*), ou ficolinas presentes no soro, aos carboidratos de

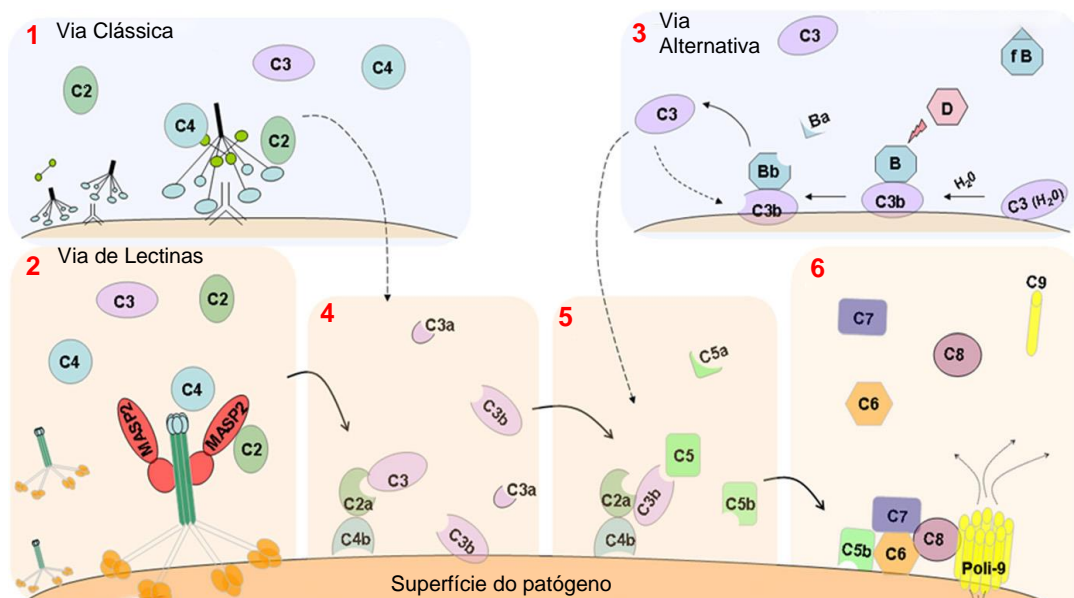
superfície de patógenos por um processo dependente de Ca^{2+} . Estas moléculas circulam no soro associadas à serino proteases MASP (MBL-Associated Serine Proteases) também por um processo dependente de Ca^{2+} . As lectinas possuem uma afinidade para glicoses, manoses e N-acetil-glucosaminas e ficolinas ligam aos resíduos de galactoses e N-acetil-glucosaminas. Após a ligação das lectinas e ficolinas na superfície do patógeno, as MASPs são ativadas, C2 e C4 são clivadas e C3 convertase similar à via clássica (C4b2a) é formada. Há três formas de MASPs descritas: MASP 1-3. MASP-1 é capaz de clivar C2, enquanto MASP-2 pode clivar C2 e C4. A diferença do complexo C1 que contém C1r e C1s, a maioria das lectinas estão associadas a MASP-1 ou MASP-2. MASP-3 também liga às lectinas e ficolinas mas não é capaz de clivar C2 e C4, acha-se que poderia ter uma função regulatória (MERLE *et al.*, 2015a).

c. **A via alternativa**, que é ativada pela ligação da molécula C3b ou C3 hidrolisado ($\text{C3H}_2\text{O}$) a proteínas na superfície de patógenos. A molécula $\text{C3H}_2\text{O}$ provém da hidrólise espontânea de C3 que ocorre em baixos níveis no soro mas pode ser acelerada por interações entre C3 e certas moléculas, por exemplo superfícies lipídicas. Depois da hidrólise, C3 sofre uma alteração conformacional expondo o sítio de ligação para o fator B; C3 se associa ao fator B, um processo dependente de Mg^{2+} . $\text{C3H}_2\text{O}$ -B, é clivado pelo fator D (serino protease) gerando um complexo que possui atividade C3 convertase $\text{C3(H}_2\text{O)Bb}$, denominado C3 convertase em fase fluida. $\text{C3(H}_2\text{O)Bb}$ cliva C3 gerando C3a e C3b. A C3b rapidamente liga à superfície dos patógenos (pelos carboidratos) ou é degradado. A produção de C3b intensifica a ativação da própria via alternativa dado que C3b se associa com o fator B (também dependente de Mg^{2+}) formando um complexo, que é clivado pelo fator D gerando a C3 convertase C3bBb . Moléculas de C3b, provenientes das outras vias, também podem ativar a via alternativa (CESTARI *et al.*, 2009; MERLE *et al.*, 2015a).

A C3 convertase, que é o complexo proteico chave (após ativação das vias), primeiramente gera C3b que atua na formação da C5 convertase (C4b2a3b ou C3bBb3b). A C5 convertase cliva C5 em C5a e C5b. O fragmento C5b se insere na membrana formando uma âncora junto aos componentes C6, C7 e C8. Essa âncora permite a formação de um poro na membrana formado por um conjunto de componentes C9 (poli-9). Este poro permite a passagem de água e íons livremente

resultando no desequilíbrio osmótico e ruptura das células. (WALPORT, 2001; CESTARI *et al.*, 2013; EVANS-OSSES *et al.*, 2013; MERLE *et al.*, 2015a, 2015b).

FIGURA 2 – ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO



FONTE: Adaptado de CESTARI *et al.* (2013).

NOTA: O sistema complemento é ativado por três vias: **1)** clássica, **2)** lectina, e **3)** alternativa. **1)** A ativação da via clássica depende principalmente de uma resposta de anticorpos contra o patógeno; o complexo C1 liga a anticorpos que reconhecem o patógeno; uma vez ligado, o complexo C1 é ativado e cliva C2 e C4 para gerar a C3 convertase C4b2a. **2)** A via das lectinas é ativada quando lectinas ou ficolinas reconhecem carboidratos na superfície do patógeno. Eles formam um complexo com MASPs (MASP2 é mostrado no diagrama) que clivam C2 e C4 resultando na formação C3 convertase C4b2a. **3)** A ativação da via alternativa é dependente principalmente de C3b, que pode ser formado pela hidrólise espontânea de C3 (H₂O) ou pelo C3b gerado pela ativação das vias clássica e de lectina. C3 (H₂O) ou C3b formam um complexo B; fator B é clivado pelo D gerando um complexo com atividade C3 convertase. A C3 convertase cliva C3 em C3a e C3b; C3b se associa à C3 convertase (C4b2a ou C3bBb, apenas mostrado C4b2a) formando a C5 convertase C4b2a3b (**5**). A convertasa C5 cliva C5 em C5a e C5b. O fragmento C5b juntamente com C6, C7, C8 e C9 permite a formação de um poro.

Além disso, a C3b também é processada para gerar C3bi e C3d, que atuam como ligantes (ou opsoninas) para receptores de células B, fagócitos e células dendríticas foliculares levando a destruição dos micróbios por fagócitos. O processamento de proteínas do sistema complemento também gera C3a e C5a, que atuam como anafilatoxina mediando a resposta inflamatória. C5a também é uma proteína quimiotática para leucócitos. Desta forma, a cascata do complemento também apoia e promove a função dos mecanismos à jusante da resposta imune (WALPORT, 2001).

O sistema complemento também tem um papel importante em condições fisiológicas normais. Um nível muito baixo de C3b é sempre mantido pela hidrólise

espontânea de C3, como foi explicado acima. As moléculas de C3b que ligarem nas células hospedeiras saudáveis, são rapidamente inativadas por um exército de moléculas reguladores de complemento expressas na membrana plasmática. Porém, tanto patógenos como as células apoptóticas, que têm a membrana alterada, não possuem tais reguladores e portanto são lisados (MERLE *et al.*, 2015a). Portanto, o sistema complemento contribui para a vigilância imunológica e está envolvido na eliminação de células próprias (alteradas) de uma maneira imunologicamente silenciosa (MERLE *et al.*, 2015a, 2015b).

Contudo, a ativação excessiva do sistema de complemento tem efeitos graves e pode levar ao desenvolvimento de várias doenças (LAMBRIS *et al.*, 2008). Nesse sentido, várias proteínas, denominadas proteínas reguladoras do complemento, estão envolvidas na regulação no sistema complemento, restringindo a ativação do sistema apenas para alvos específicos e por um tempo limitado (LINDAHL *et al.*, 2000; LAMBRIS *et al.*, 2008; MERLE *et al.*, 2015a).

2.3 O SISTEMA COMPLEMENTO E *Trypanosoma cruzi*

2.3.1 *Trypanosoma cruzi* é morto pelo sistema complemento

Vários estudos têm demonstrado que o *T. cruzi* é morto pelo sistema complemento. Os primeiros trabalhos de ativação das vias do complemento com *T. cruzi* mostraram que a forma epimastigota (usado como modelo de estudo dado que pode ser cultivado *in vitro*) é lisada por meio da via alternativa (NOGUEIRA *et al.*, 1975; JACOBSON *et al.*, 1992); e que os epimastigotas e os tripomastigotas metacíclicos obtidos dos triatomíneos foram mortos pelo sistema complemento na presença de soro não imune (ou seja, soro normal) (SCHENKMAN *et al.*, 1986; YOSHIDA e ARAGUTH, 1987).

Atualmente, sabe-se que as três vias promovem a lise do parasito. Na fases iniciais da infecção *T. cruzi* torna-se um alvo das vias alternativas e de lectina do sistema complemento. Trabalhos iniciais do nosso laboratório, demonstraram que as proteínas MBL e ficolinas se ligam à superfície dos epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos, fornecendo a primeira evidência de que a via das lectinas é ativada no soro não imune pelo *T. cruzi*. Foi observada que esta via é responsável por quase 70% da lise parasitária mediada pelo complemento durante a infecção e que a via

alternativa é ativada por uma baixa taxa de conversão espontânea de C3 a C3b ou por C3b gerada a partir das outras vias do complemento (CESTARI *et al.*, 2009; CESTARI e RAMIREZ, 2010).

Por outro lado, a ativação da via clássica é dependente de anticorpos. Sabe-se que o parasito *T. cruzi* apresenta na superfície moléculas ricas em carboidratos tais como mucinas, trans-sialidases e outros, que são ancoradas na superfície por GPI. Almeida e colaboradores (1991 e 1994) observaram que o soro de pacientes com doença de Chagas em estágio crônico tinham um nível elevado de anticorpos anti- α -galactosil. Vale destacar que o soro humano normal contém este anticorpo, (representa ~1% das imunoglobulinas IgG), o único IgG conhecida por estar presente em todos os humanos, a menos que estejam imunocomprometidos (GALILI, 2005). Esses anticorpos reconhecem epítomos α -galactosil, que são abundantes em glicolípídeos e glicoproteínas na superfície de patógenos como *T. cruzi*. Os anticorpos anti- α -galactosil, obtidos de pacientes com doença de Chagas em estágio crônico foram capazes de reconhecer antígenos de superfície ancorados ao GPI de tripomastigotas, sendo capazes de promover a lise (ALMEIDA *et al.*, 1991; ALMEIDA *et al.*, 1994). De igual modo, os anticorpos anti- α -galactosil do soro humano normal ligaram à superfície de tripomastigotas, no entanto mostraram uma afinidade menor (ALMEIDA *et al.*, 1991; ALMEIDA *et al.*, 1994). Mais recentemente, Cestari e Ramirez (2010) detectaram a presença de C1q, uma molécula associada à via clássica, na superfície de *T. cruzi* (epimastigotas) em várias cepas.

Estes trabalhos demonstraram que o soro humano normal contém anticorpos naturais (em baixo nível) que são capazes de reconhecer epítomos na superfície de *T. cruzi*. No entanto, à medida que a infecção progride e anticorpos anti - *T. cruzi* são produzidos, esses anticorpos específicos também ligarão à superfície do parasito e interagirão com a molécula de complemento C1, ativando assim a via clássica (CARDOSO *et al.*, 2016).

2.3.2 Mecanismos de evasão à ação do sistema complemento pelo *Trypanosoma cruzi*

Devido à sua capacidade de reconhecer e eliminar rapidamente patógenos, o sistema do complemento é considerado um componente essencial do sistema imune. Portanto, a capacidade de patógenos para estabelecer com sucesso uma

infecção é dependente de sua capacidade de evadir à ação do complemento. Não é surpreendente, então que patógenos como *T. cruzi* desenvolveram estratégias para escapar a lise pelo sistema complemento.

Uma série de moléculas envolvidas no mecanismo de resistência à lise mediada pelo complemento têm sido descritas em *T. cruzi* e foi revisado por vários autores incluindo Cestari e colaboradores (2013). Alguns exemplos destas moléculas são descritas no seguinte:

a. A calreticulina, uma molécula de superfície de 45 kDa, interage com C1, impedindo a sua interação com C4 e portanto inibe a via clássica do complemento. A calreticulina também se liga às moléculas de MBL presentes no soro, impedindo a sua interação com manose do parasito inibindo a via de lectinas (FERREIRA *et al.*, 2004). Portanto, a calreticulina é capaz de interromper os passos iniciais das vias clássica e de lectina, e, o fato de que a formação de C3 convertase é reduzida, indirectamente a calreticulina também inibe a via alternativa.

b. O CRP (*Complement Regulatory Protein*), também chamada GP160, é uma proteína de superfície ancoradas a GPI de tripomastigota, que se liga a C4b e C3b dissociando a C3 convertase das vias clássica e alternativa (NORRIS, 1998).

c. O T-DAF (*Trypomastigote-Decay Accelerating Factor*) é uma proteína de superfície de 87-93 kDa (similar ao fator de aceleração de decaimento humano ou DAF), que interfere com a eficiência de montagem C3 convertase, afectando assim as três vias do complemento (TAMBOURGI *et al.*, 1993).

d. O CRIT (*Complement C2 Receptor Inhibitor Trispanning*), é uma proteína transmembrana presente na fase infectiva do *T. cruzi*. O CRIT bloqueia a clivagem de C2 em C2a, impedindo a formação de C3 convertase e portanto as vias clássica e de lectinas (CESTARI *et al.*, 2008).

Em resumo, os mecanismos de evasão à ação do sistema complemento empregado pelo *T. cruzi* centram-se na diversidade moléculas que interrompem ou inibem a formação de C3-convertase (um passo fundamental em todas as vias do complemento), ou neutralizam os passos iniciais da cascata do complemento impedindo a atividade serino protease do complexo C1, MASP ou fator D. Como todas as vias do complemento convergem com a formação de C3 convertase, interrompendo este passo chave é uma maneira eficiente para perturbar todas as vias simultaneamente. Além de ser importante na cascata do complemento, C3b

também tem um papel opsonizante; atua como ligante para fagócitos induzindo a fagocitose. Portanto, inibindo a formação de C3b também pode reduzir a lise do parasito pelos fagócitos durante a infecção (CARDOSO *et al.*, 2016).

Outra estratégia de evasão do sistema imune empregado pelo *T. cruzi* é mediante a liberação de vesículas extracelulares, entre elas principalmente microvesículas. Estas vesículas estão envolvidas em diversos processos de evasão do sistema imune, incluindo a ligação e a inibição da atividade do C3 convertase (C4b2a) do complemento (CESTARI *et al.*, 2012). A relevância das microvesículas será discutida na seguinte seção.

2.4 AS MICROVESÍCULAS

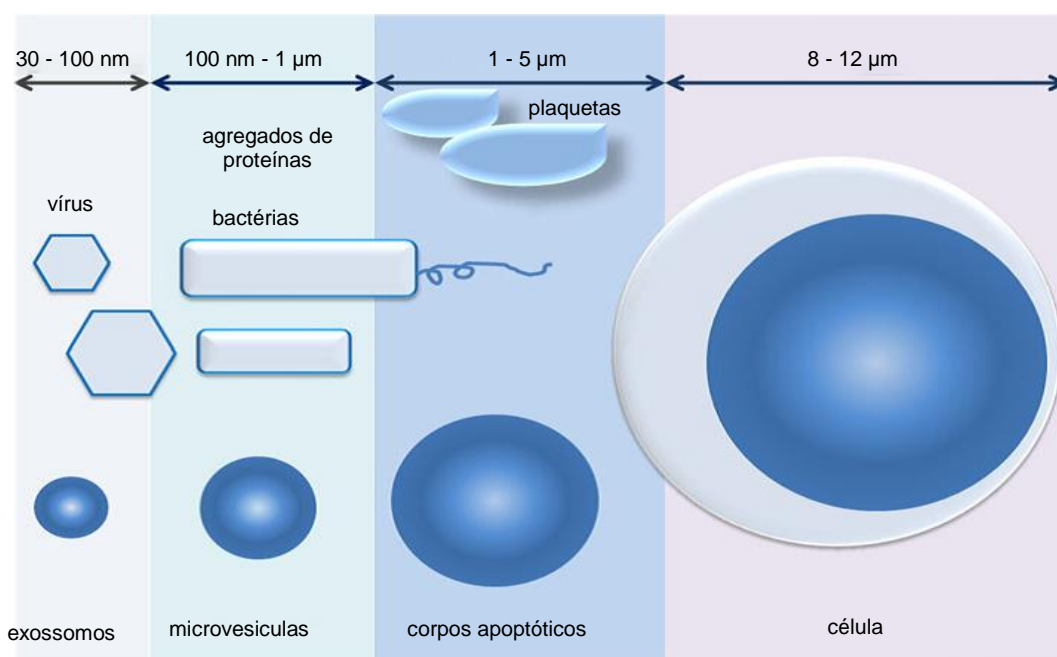
Tanto procariotas como eucariotas têm desenvolvido estratégias elegantes de comunicação celular e tais interações celulares diretas e indiretas ocorrem por muitos mecanismos. Por exemplo, as bactérias constantemente monitoram seu meio ambiente e secretam moléculas de sinalização, as quais influenciam o comportamento de outras bactérias, um processo conhecido como *quorum sensing* (interação indireta) (MILLER e BASSLER, 2001). Interações diretas como junções comunicantes e comunicação célula-célula, mediada por moléculas sinais localizadas na membrana plasmática de uma célula interagindo com receptores inseridos na membrana da célula alvo, bem como interações indiretas como a secreção de moléculas como hormônios e citocinas são exemplos das estratégias de comunicação celular descritas entre células eucarióticas. Até recentemente, pensava-se que as interações celulares indiretas são exclusivamente facilitadas pela secreção e transferência de moléculas. Hoje em dia, sabe-se que existe outro mecanismo mediando a interação celular indireta; as vesículas extracelulares ou VEs (YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015).

Inicialmente considerado detrito celular, as VEs têm surgido como elementos-chaves para a transferência horizontal de informações entre as células sem contato celular direto. As VEs são pequenas vesículas compostas por uma bicamada lipídica e possuem um diâmetro de < 100 nm a 5.000 nm.

Atualmente, as VEs são classificadas em exossomos, microvesículas (MVs) e corpos apoptóticos. Os exossomos (30 a 100 nm, geralmente <100 nm) são formados no interior da rede endossomal dentro de corpos multivesiculares. A

liberação dos exossomos ocorre pela fusão dos corpos multivesiculares com a membrana plasmática e posterior exocitose dos exossomos ao meio extracelular. Em contraste com os exossomos, as MVs, anteriormente conhecidas como micropartículas ou ectossomos, são uma população heterogênea de vesículas com um diâmetro de 100 a 1000 nm. As MVs não são geradas na via endocítica como os exossomos; são produzidas pela brotação da membrana plasmática que eventualmente separam por fissão e a consequente liberação ao espaço extracelular. Portanto, embora os tamanhos dos MVs e exossomos sobreponham, a principal diferença entre os dois tipos de vesículas reside na sua biogênese e liberação. Por outro lado, os corpos apoptóticos, normalmente entre 1.000 e 5.000 nm, são liberados como bolhas de células durante as etapas finais de apoptose (FIGURA 3) (YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015).

FIGURA 3 – FAIXAS DE TAMANHO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES



FONTE: Adaptado de GYÖRGY *et al.* (2011).

NOTA: A distribuição de tamanho dos exossomos coincide com o tamanho dos vírus (representados pelas formas hexagonais), enquanto as microvesículas se sobrepõem em tamanho com bactérias (figuras retangulares) e agregados de proteínas por exemplo imunocomplexos (ilustração não mostrada). Os corpos apoptóticos caem no intervalo de tamanho das plaquetas (representadas pelas formas ovais). Célula, representada pelo círculo, é usada apenas para demonstrar as diferenças em tamanho entre VEs e células. Na região superior da figura estão indicadas as escalas de tamanho.

As MVs foram primeiramente descritas como partículas derivadas de plaquetas no plasma livre de plaquetas com o potencial de gerar trombina por

Chargaff e West em 1946 e após como poeira de plaquetas por Wolf em 1967 (CHARGAFF e WEST, 1946; WOLF, 1967). O papel das MVs em processos fisiológicos e na evolução de doenças foi recentemente reconhecida e nos últimos anos tem recebido muita atenção (LÖTVALL *et al.*, 2014). Praticamente todo tipo celular examinado até agora tem sido capaz de liberar MVs e as características fenotípicas das MVs depende da célula de origem (PAP *et al.*, 2009; LAI *et al.*, 2014).

A membrana das MVs consiste em moléculas típicas de membrana da célula de origem incluindo lipídios, proteínas e glicoconjugados. Estas proteínas de superfície podem ser proteínas ubíquas como integrinas ou proteínas típicas da célula de origem. Por exemplo, a membrana das MVs de macrófagos contém o ligando para P-selectina que lhes permite ligar as plaquetas (DEL CONDE *et al.*, 2005). A membrana de algumas MVs contém níveis altos de colesterol; citando como análogo as MVs de neutrófilos nas quais foi visto que a inibição farmacológica de colesterol inibe a formação de MVs (DEL CONDE *et al.*, 2005; PILZER *et al.*, 2005). Balsas lipídicas (comumente referida como *lipid rafts* na literatura), também têm sido observadas na membrana de algumas MVs; balsas lipídicas refere-se aos conjuntos dinâmicos de proteínas e lipídios (notavelmente colesterol) na membrana plasmática que estão envolvidas em processos como endocitose e transdução de sinal (SIMONS e SAMPAIO, 2011). O conteúdo das MVs incluem proteínas específicas das células parentais; além de proteínas, o lúmen das MVs podem conter ácidos nucleicos como mRNA e miRNA (COCUCCI *et al.*, 2009; PAP *et al.*, 2009; KANADA *et al.*, 2015). Alguns pesquisadores sugerem que a liberação das MVs não ocorre em locais arbitrários na membrana celular, mas em locais específicos que são enriquecidos com certos lipídios e proteínas (PAP *et al.*, 2009; MURALIDHARAN-CHARI *et al.*, 2010). Em resumo, em termos de estrutura e composição, tanto o padrão molecular da membrana e o conteúdo interno das vesículas dependem da célula de origem.

As MVs são liberadas constantemente (nível basal) e sua liberação aumenta por meio de um estímulo exógeno. Vários estímulos podem induzir a liberação de MVs e sabe-se que independentemente do estímulo, a liberação de MVs ocorre com algum atraso, de dezenas de segundos a 1-2 minutos. Em alguns tipos celulares, tem demonstrado que a ativação de certos receptores, estimula a secreção de MVs; a ativação dos receptores purinérgicos em células dendríticas e macrófagos induz a

formação de MVs. Em outras células a ativação da proteína quinase C (PKC) por ésteres de forbol também é eficaz (BAJ-KRZYWORZEKA *et al.*, 2006). Talvez o estímulo, levando à formação de MVs, que parece ser a mais relevante até agora é a elevação do nível intracelular de Ca^{2+} . Este fenómeno tem sido descrito em muitos tipos de células incluindo células dendríticas, monócitos e plaquetas (PILZER *et al.*, 2005; SAVINA *et al.*, 2005; RATAJCZAK *et al.*, 2006).

O aumento intracelular de Ca^{2+} aumenta a função da escramblase, uma enzima envolvida na alteração da assimetria dos fosfolípidos da membrana plasmática. Por outro lado, este aumento de Ca^{2+} inativa a enzima translocase que também é responsável por manter fosfatidilserina (PS) e fosfatidiletanolamina (PE) no lado interno (citoplasmático) da membrana. Como consequência, os fosfolípidos PS e PE são translocados para a superfície externa da membrana (extracelular) (COCUCCI *et al.*, 2009). Portanto, a formação das MVs está associada à perda da assimetria da membrana plasmática. Isso é confirmado com o fato de que algumas MVs exibem grandes quantidades de PS e na superfície externa permitindo a ligação de anexina V. Apesar de que anexina V é regularmente utilizada como um marcador para MVs, em estudos recentes têm sido visto que algumas MVs são anexinaV-negativas. Por exemplo, foi determinado que 80% das MVs, no plasma sanguíneo, derivadas de plaquetas são anexina V-negativas (CONNOR *et al.*, 2010; GYÖRGY *et al.*, 2011). O aumento intracelular de Ca^{2+} também permite a reorganização do citoesqueleto e subsequentemente a liberação das MVs, através da ativação de proteases citosólicas, tais como a calpaína. A calpaína cliva talina e α -actinina levando à ruptura da rede proteica do citoesqueleto da membrana plasmática (PAP *et al.*, 2009).

Depois de ser liberadas as MVs não permanecem no espaço extracelular por muito tempo; podem ser degradadas liberando seu conteúdo no espaço extracelular (DOLO *et al.*, 1998) ou interagem com células vizinhas (PLUSKOTA *et al.*, 2008). Há evidências de que as MVs não interagem com qualquer célula mas parece que interagem com células específicas. Por exemplo, sabe-se que as MVs de neutrófilos apenas interagem com plaquetas, macrófagos e células dendríticas.

Após ligar com as células alvo, as MVs ligam à membrana plasmática e a membrana da MV funde com a membrana da célula alvo, e o conteúdo é descarregado no citoplasma dessa célula. As MVs também podem ser endocitadas e fundir com os lisossomos para ser degradados ou fundir com o compartimento

endossomal (MULCAHY *et al.*, 2014). Portanto, desta forma as MVs facilitam a transferência específica de moléculas de uma célula para a outra ou para o espaço extracelular.

A liberação de MVs está associada a processos fisiológicos. Durante o processo de coagulação as plaquetas liberam MVs revestidas de moléculas (como o fator TF) importantes para a cascata de coagulação (BASTIDA *et al.*, 1984; HEIJNEN *et al.*, 1999). Também as MVs são conhecidas para participar no processo de inflamação; as MVs de neutrófilos estimulam a secreção de mediadores de inflamação em macrófagos (GASSER e SCHIFFERLI, 2004). Por outro lado, alguns autores sugerem que as MVs poderiam ter um papel na remoção de componentes do sistema complemento da superfície celular em condições fisiológicas. Como foi explicado anteriormente, o sistema complemento (via alternativa) é mantido ativado em níveis muito baixos em estado fisiológico, e ademais das moléculas reguladores de complemento, a formação das MVs poderia estar atuando para atenuar a ação do complemento (MORGAN *et al.*, 1987; PILZER *et al.*, 2005; AL-NEDAWI *et al.*, 2009).

Por outro lado, tem sido observado que há um aumento de MVs durante várias doenças. Citando caso análogo, no microambiente de tumores, existe uma grande quantidade de MVs provenientes de células tumorais. Sabe-se que estas MVs facilitam o transporte de substâncias, que favorecem a propagação do câncer (GINESTRA *et al.*, 1998). Um fato interessante é que tem visto a acumulação de fármacos anticâncer em MVs liberadas de células tumorais previamente tratadas com drogas, o que implica as vesículas poderiam estar envolvidas nos mecanismos de resistência aos fármacos em células malignas (SHEDDEN *et al.*, 2003). Agentes patogênicos também usam MVs para transferir fatores de virulência ao hospedeiro, contribuindo na evolução da doença e para evadir a ação do sistema imune do hospedeiro, como foi visto nas infecções virais, infecções bacterianas e infecções provocadas por protozoários parasitas (TROCOLI-TORRECILHAS *et al.*, 2012; LAI *et al.*, 2014; MANTEL e MARTI, 2015). Recentemente, foi demonstrado que as MVs tem um papel importante na infecção por *T. cruzi* e isso será discutido na seguinte seção.

2.4.1 O papel das microvesículas na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

A liberação de vesículas por *T. cruzi*, foi descrita pela primeira vez por Gonçalves e colaboradores, há mais de 25 anos. Os pesquisadores observaram, através de microscopia eletrônica, que tripomastigotas sanguíneos (cepas Y, YuYu, CA1 e RA) libera vesículas extracelulares variando entre 20 e 80 nm de diâmetro. Tais vesículas foram encontradas em proximidade com a membrana do parasito (GONÇALVES *et al.*, 1991). Desde então, vários estudos têm sido feitos para a entender a composição e o papel ou efeito das vesículas extracelulares de *T. cruzi* no processo de infecção.

2.4.1.1 Composição de vesículas de *Trypanosoma cruzi*

Atualmente, sabe-se que as MVs de *T. cruzi* contém fatores importantes de virulência que contribuem para a interação parasito-hospedeiro e o estabelecimento da infecção dado que estas MVs podem estar atuando como mensageiros, preparando o ambiente celular para facilitar a infecção, e garantindo assim a sobrevivência do parasito (BAYER-SANTOS *et al.*, 2013). A análise proteômica das vesículas derivadas de *T. cruzi* (clone DM28c) revelou que as vesículas contêm proteínas envolvidas no metabolismo, de sinalização, de ligação de ácidos nucleicos e sobrevivência do parasito e virulência (BAYER-SANTOS *et al.*, 2013). Além disso, o nosso grupo publicou um trabalho da análise proteômica das MVs derivadas da interação entre *T. cruzi* e células hospedeiras. Essas MVs contêm proteínas tanto das células hospedeiras (proteínas importantes para a arquitetura do citoesqueleto como tubulina e actina e proteínas do estresse como proteínas do choque térmico) como dos parasitos (proteínas importantes para a interação parasito-hospedeiro como as *trans*-sialidases). Ademais, neste mesmo trabalho foi visto a capacidade dessas MVs para fundir-se uns com os outros (RAMIREZ *et al.*, 2016).

Além disso, Bayer-Santos e colaboradores mostraram que vesículas geradas pelos epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos (clone DM28c) contêm diversos tipos de pequenos RNAs (BAYER-SANTOS *et al.*, 2014). Foi observado recentemente alterações na expressão gênica em células HeLa, após a incorporação de vesículas de parasitos contendo pequenos RNAs derivados de tRNA (tsRNAs) de *T. cruzi*, clone DM28c (GARCIA-SILVA, *et al.*, 2014),

demostrando a capacidade das MVs de transferir informação genética entre diferentes células.

Cabe mencionar que estudos, realizados com o microscópio eletrônico mostraram que o diâmetro das MVs de *T. cruzi* (clone DM28c e cepa Silvio X10/6) são aproximadamente de 100 a 500 nm (CESTARI *et al.*, 2012; BAYER-SANTOS *et al.*, 2013).

2.4.1.2 Relevância das vesículas de *Trypanosoma cruzi* durante a infecção

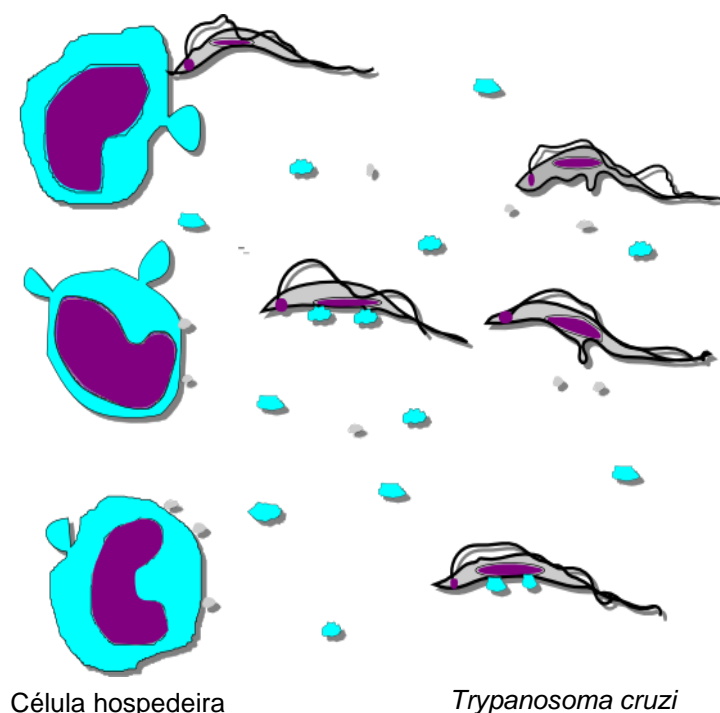
Trocoli-Torrecilhas e colaboradores realizaram um dos primeiros trabalhos para avaliar o papel das vesículas de *T. cruzi* na infecção. No trabalho, vesículas foram isolados de tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* (cepa Y); posteriormente, as vesículas foram injetados em camundongos antes de infectar eles com o parasito. Foi visto que a inoculação prévia com vesículas liberadas por *T. cruzi* acelerou e aumentou a taxa de mortalidade dos camundongos infectados; e que os camundongos infectados com vesículas desenvolveram uma patologia cardíaca grave com uma reação inflamatória intensa e um maior número de ninhos de amastigotas (TROCOLI-TORRECILHAS *et al.*, 2009).

O nosso grupo já tinha mostrado que além de produzir suas próprias MVs, os tripomastigotas (metacíclicos e sanguíneos) de *T. cruzi* (cepa Silvio X10/6) induz a liberação de MVs de células hospedeiras (em um processo dependente de Ca^{2+}), particularmente monócitos, para evitar a lise mediada pelo complemento e também para facilitar a invasão na célula hospedeira (FIGURA 4) (CESTARI *et al.*, 2012). Os autores observaram que as MVs, liberadas durante a interação parasito-célula hospedeira, inibem as vias clássica e de lectinas do sistema do complemento, aumentando a sobrevivência do parasito. Esta inibição é mediada por MVs derivadas do hospedeiro que se ligam à C3 convertase (C4b2a) na superfície de *T. cruzi*, o qual conduz à inibição da sua actividade catalítica (CESTARI *et al.*, 2012). Além disso, o nosso grupo demonstrou que as MVs derivadas de linfócitos e monócitos transportam a citocina TGF- β (CESTARI *et al.*, 2012). A TGF- β , realiza muitas funções celulares, incluindo o estabelecimento de tolerância imunológica e é um agente imunossupressor potente. Trabalhos anteriores mostraram que TGF- β causa um aumento de invasão de *T. cruzi* em várias linhas celulares (MING *et al.*, 1995) e como foi explicado anteriormente inibiu a atividade tripanocídica de

macrófagos (ABRAHAMSOHN, 1998), porém Cestari e colaboradores demonstraram que as MVs carregando TGF- β também causa um aumento de invasão em células mamíferas *in vitro*. Este aumento na invasão foi demonstrada também *in vivo*; camundongos infectados com *T. cruzi* na presença de MVs positivas para TGF- β , apresentaram um aumento de parasitemia (CESTARI *et al.*, 2012).

Em conjunto, estes dados indicam que as MVs desempenham um papel importante no estabelecimento e manutenção de infecção pelo parasito. É possível concluir que *T. cruzi* emprega esta estratégia para liberar os principais componentes da superfície que estão envolvidos no processo de invasão, bem como evadir os mecanismos do sistema imune do hospedeiro. As vesículas então, poderiam atuar como mensageiras para preparar as células hospedeiras para a entrada do parasito.

FIGURA 4 – MVS DA INTERAÇÃO DE *Trypanosoma cruzi* E AS CÉLULAS HOSPEDEIRAS



FONTE: O autor (2017).

NOTA: Durante a interação *T. cruzi*-célula hospedeira, os parasitos liberam vesículas (representadas pelos círculos azuis), que contêm fatores de virulência; estas vesículas interagem com as células hospedeiras transferindo moléculas parasitárias ao hospedeiro. Além disso, *T. cruzi* induz a produção de MVs (representadas pelos círculos verdes) de células hospedeiras. Tais MVs se ligam aos parasitos protegendo-os da lise mediada pelo complemento e assim facilitando a invasão de células hospedeiras. Sabe-se que ambos tipos de MVs podem fundir-se (ilustração não mostrada).

Embora seja evidente que vários estudos têm sido feitos para entender a relevância das vesículas de *T. cruzi* durante a infecção, estudos comparando o papel ou significado das vesículas de diferentes cepas e unidades de digitação

discretos (DTUs) de *T. cruzi* não são comuns. Recentemente, Nogueira e colaboradores demonstraram que o conteúdo proteico de vesículas isoladas de diferentes cepas de *T. cruzi* é diferente e que estas vesículas são capazes de modular diferencialmente os eventos iniciais e posteriores de respostas imunes (NOGUEIRA *et al.*, 2015).

Neste trabalho, analisamos os mecanismos de microvesiculação em diferentes cepas de *T. cruzi*, produzidas durante a interação com células hospedeiras, para avaliar diferenças no seu envolvimento na inibição do sistema complemento e nos eventos de invasão de *T. cruzi* em células eucarióticas.

3 OBJETIVOS (GERAL E ESPECÍFICOS)

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterização dos mecanismos de resistência ao sistema complemento humano e microvesiculação de diferentes cepas de *T. cruzi* durante a interação com células hospedeiras.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e caracterizar as microvesículas derivadas da interação de diferentes cepas de *T. cruzi* (que apresentam diferenças na susceptibilidade à lise mediada pelo sistema complemento) com células THP1;
- Avaliar o envolvimento das microvesículas na lise mediada pelo sistema complemento;
- Determinar o efeito das microvesículas no processo de invasão de formas metacíclicas de *T. cruzi* a células hospedeiras;
- Determinar componentes das microvesículas que poderiam ser antigênicos contra soro de pacientes chagásicos e avaliar a presença de GP82 em microvesículas liberadas durante a interação parasito-célula hospedeira;
- Avaliar a capacidade das MVs na modulação da expressão de citocinas em macrófagos, como modelo células THP-1 diferenciadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MEIOS DE CULTURA

- Meio LIT (infusão de fígado): extrato de levedura 15 g/L; Na_2HPO_4 11,56 g/L; glicose 2,2 g/L; hemina 0,02 g/L; infuso de fígado 5 g/L; KCl 0,4 g/L; NaCl 4,4 g/L; triptose 5 g/L e pH 7,2 ajustado com HCl 1M, suplementado com soro fetal bovino inativado 10% (Cultilab, Brasil) (v/v) e uma de solução de penicilina (100 IU/ml) e estreptomicina (100 µg/ml) (Pen-Strep, Sigma, EUA).

4.2 SOLUÇÕES

TABELA 1 - SOLUÇÕES UTILIZADAS E SUAS COMPOSIÇÕES

SOLUÇÃO	COMPOSIÇÃO
Ponceau S	Ponceau S 0,1% (p/v) e ácido acético 5%
Solução de bloqueio para <i>Western blot</i> :	Tampão PBS 1X; Tween-20 0,05% (v/v); leite em pó desnatado 5% (p/v)
Solução de descoloração de proteínas	Metanol:ácido acético:água destilada (30:10:60)
Solução para coloração de géis de proteínas SDS-PAGE	Azul de Coomassie R-250 0,1% em metanol:ácido acético:água destilada (45:10:45)
Solução PBST	PBS 1X e Tween-20 a 0,05%
Tampão de amostra para proteína 1X	Tris-HCl 50mM pH 6,8; glicerol 10% (v/v); SDS 2%; DTT 5 mM; azul de bromofenol 0,01%
Tampão de eletroforese para SDS-PAGE	Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%, pH 8,3
Tampão de ligação	Hepes 10 mM; NaCl 140 mM; CaCl_2 2,5 mM, pH 7,4
Tampão de lise RIPA	Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 150 mM; Na_2EDTA 1 mM, EGTA 1 mM; pirofosfato de sódio 2,5 mM; β -glicerofosfato 1 mM; NP-40 1%; desoxicolato de sódio 1%; leupeptina 1 µg/ml
Tampão HEPES	Hepes 10 mM; NaCl 140 mM, pH 7,4
Tampão PBS1X (solução de uso)	NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na_2HPO_4 , 10,0 mM; KH_2PO_4 1,8 mM, pH 7,4.
Tampão PBSPG	PBS1X e glicose 2% (v/v), pH 8,0.

(Continua)

(Conclusão)

SOLUÇÃO	COMPOSIÇÃO
TBE 1X (solução de uso)	Tris-Base 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM.

4.3 CULTURA DE CÉLULAS

Parasitas: Foram utilizados neste trabalho parasitos da espécie *T. cruzi* das seguintes linhagens: cepas Colombiana, G, Sylvio X10/6 e Y; e clone CL Brener (TABELA 2). As culturas axênicas das formas epimastigotas desses parasitos foram mantidas em fase logarítmica de crescimento (com densidade celular entre 1 e 2 x 10⁷ parasitos/ml) em meio LIT completo a temperatura de 28°C (CAMARGO *et al.*, 1964).

TABELA 2 - CLASSIFICAÇÃO DAS CEPAS DE *Trypanosoma cruzi*

CEPA/CLONE	CLASSIFICAÇÃO	PAÍS	HOSPEDEIRO/VETOR
G	<i>T. cruzi</i> I	Amazonas, Brasil	Opossum/Gambá
Clone - CL Brener	<i>T. cruzi</i> VI	Rio Grande do Sul, Brasil	<i>Triatoma infestans</i>
Colombiana	<i>T. cruzi</i> I	Colômbia	<i>Homo sapiens</i>
Sylvio X10/6	<i>T. cruzi</i> I	Pará, Brasil	<i>Homo sapiens</i>
Y	<i>T. cruzi</i> II	São Paulo, Brasil	<i>Homo sapiens</i>

FONTE: Adaptado de ZINGALES *et al.* (2009).

Células: As linhagens celulares do rim do macaco verde africano (Vero) e do monócito humano (THP-1) foram mantidas em meio RPMI 1640 (Sigma, EUA – com adição de NaHCO₃ 2 g/L; Hepes 4,8 g/L; pH 7,4 ajustado com NaOH 5M) suplementado com 10% soro fetal bovino inativado, penicilina (100 IU/ml) e estreptomicina (100 µg/ml), em estufa umidificada a 37°C sob atmosfera controlada de 5% CO₂.

4.4 DIFERENCIAÇÃO DE EPIMASTIGOTA PARA TRIPOMASTIGOTA METACÍCLICO (METACICLOGÊNESE)

Para a metaciclogênese *in vitro*, epimastigotas no início da fase estacionária ou seja, no quinto dia de cultivo com densidade celular de aproximadamente $5 \text{ e } 7 \times 10^7$ parasitos/ml foram usados.

Uma alíquota de 10 μl da suspensão do epimastigotas foi diluída a 190 μl de tampão PBS, ou seja fator de diluição=20, e a contagem foi feita a partir de uma alíquota de 10 μl na câmara de Neubauer (Boeco, Alemanha) sob o microscópio ótico com a objetiva de 40X. O cálculo do número de parasitos por ml foi determinado (número de parasitos contados x fator de diluição x 10^4). Depois disso, o volume do cultivo parasitário que contém aproximadamente 1×10^8 epimastigotas foram coletados e centrifugados a 2.000xg por 10 minutos a 4°C. Os epimastigotas ($\sim 1 \times 10^8$) foram ressuspensos em 5 ml de meio LIT completo juntamente com 35 ml de meio Grace (Sigma – com adição de NaHCO_3 0,35 g/L; pH 6,6 ajustado com NaOH 5M) em garrafas médias (75 cm^2), incubados a 28°C por 5-7 dias.

4.5 PURIFICAÇÃO DAS FORMAS METACÍCLICAS DE *Trypanosoma cruzi*

Os tripomastigotas metacíclicos foram obtidos da cultura por purificação por coluna de troca iônica DEAE celulose (SIGMA), equilibrada com tampão PSG. Os parasitos foram colhidos por centrifugação a 4.000xg a 4°C e ressuspensos em 1 ml de tampão PSG a 4°C. Em seguida a suspensão foi inoculada em uma coluna contendo lã de vidro na base e acima aproximadamente 3 ml de DEAE celulose. As formas tripomastigotas metacíclicos passam pela coluna enquanto que as formas epimastigotas ficam retidas (TEIXEIRA e YOSHIDA, 1986). A pureza da purificação foi determinada através da quantificação dos parasitos por contagem direta em câmara de Neubauer e da visualização em microscópio ótico após coloração dos parasitos com Giemsa (Merck, Alemanha). Os tripomastigotas foram usados imediatamente depois de purificar.

4.6 SORO HUMANO NORMAL

Soro humano normal (SHN) foi obtido por meio de doação de voluntários saudáveis. Sangue total dos voluntários recém colhido foi incubado, deixando-o sem

ser perturbado, a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir a coagulação. Depois disso, o sangue foi centrifugado a 2.000xg por 15 min a 4°C na ausência de qualquer tipo de anticoagulante ou quelante de íons. Imediatamente, o sobrenadante ou seja o soro foi distribuído em microtubos estéreis. As alíquotas de soro foram armazenadas a -80° C até a utilização.

4.7 SORO HUMANO DE PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS

As alíquotas de soro humano de pacientes chagásicos (crônicos) foram obtidas da Profa. Iara de Messias-Reason do laboratório de Imunopatologia, Departamento de Patologia Médica, UFPR. Foi realizada uma mistura aleatória de 4 soros para os ensaios para uso nos ensaios de *Western Blot*.

O uso do soro humano foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR, sob o protocolo CAAE: 0133.0.208.000-07 (ANEXO A).

4.8 INDUÇÃO DE MICROVESÍCULAS DA INTERAÇÃO *Trypanosoma cruzi* E CÉLULAS THP-1 E ANÁLISE

Tripomastigotas metacíclicos, purificados através de coluna DEAE, foram incubados em uma relação 10:1 com células THP-1 ao final da fase log (1×10^7 parasitos/ml e 1×10^6 células/ml). As células foram pré-incubadas durante 1 h em meio RPMI 1640 sem soro, lavadas e ressuspensas em RPMI 1640/CaCl₂ (1 mM). A viabilidade das células foi avaliada pelo método de exclusão do corante vital azul de tripano 0,2% (Sigma). Uma alíquota de 30 µl da suspensão de células foi adicionada a 30 µl do corante azul de tripano 0,4%, ou seja fator de diluição=2, para contagem das células na câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi calculada conforme foi descrito por SIGMA (2010).

Durante o estímulo, as células juntamente com os parasitos foram incubados a 37°C durante 1 h sob agitação linear (80 RPM) e em seguida 5 min em gelo para parar a reação. MVs foram obtidas por centrifugação diferencial de 5 min a 160xg para remover as células, duas centrifugações de 4.000xg durante 30 min para remover células residuais e debris celular, e logo ultracentrifugação a 100.000xg por uma hora e 30 min (CESTARI *et al.*, 2012). Para a ultracentrifugação utilizou-se a

ultracentrífuga Beckman Coulter Optima MAX-XP com o rotor de oscilação de alumínio MLS-50. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (*pellet*) foi ressuspensão no tampão HEPES gelado.

4.8.1 *Determinação da concentração de proteína em MVs*

As concentrações de proteína nas MVs foram determinadas utilizando o *kit* de ensaio de proteína Micro-BCA (Thermo Scientific, EUA) conforme descrito pelo fabricante.

4.8.2 *Análise de MVs por citometria de fluxo*

Para determinar o número de MVs obtido, bem como, a porcentagem das MVs anexina V-positivo, as MVs foram analisadas por citometria de fluxo. Após a ultracentrifugação, as MVs foram ressuspensas em 100 µl de tampão de ligação e 5 µl de anexina V conjugado ao FITC (BD Biosciences) e foram incubadas durante 1 h a temperatura ambiente (~25°C) no escuro. Depois disso, as MVs foram diluídas para 4 ml em tampão HEPES e ultracentrifugadas a 100.000xg por 1 h. Os precipitados ou '*pellets*' foram ressuspensos novamente em 400 µl do tampão de ligação e as amostras foram analisadas imediatamente por citometria de fluxo (BD Accuri C5) equipado com o programa de BD Accuri C6. 100 µl da amostra de MVs foi analisada e a fluorescência de FITC foi determinada no filtro FL-1 (533/30). Os dados gerados pela citometria de fluxo foram analisados pelo programa FCS Express Plus, versão 6 (De Novo).

Células THP-1, nas quais foi induzida a morte celular [usando um protocolo desenvolvido *in-house*: 1x10⁶/ml de células foram suspensos no tampão Hepes e foram expostas a uma temperatura de 70°C por 5 min, a viabilidade das células após o tratamento foi <30%] foram marcadas com anexina V-FITC conforme descrito pelo fabricante (BD Biosciences) e analisadas em citometria de fluxo como um tipo de controle positivo.

4.8.3 *Análise de MVs por Nanosight*

O tamanho e a concentração de MVs foram determinados por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). A técnica NTA combina microscopia de

espalhamento de luz com uma câmera de carga acoplada (CCD), que permite a visualização e a gravação de um filme das nanopartículas (neste caso, as MVs) em suspensão. As partículas são visualizadas pelo espalhamento da luz refletida por elas quando iluminadas por um laser e vídeos da luz espalhada pelas partículas são captados com a câmera CCD. O software NTA é capaz de identificar e rastrear cada nanopartícula que se desloca sob o movimento browniano e relacionar o movimento ao tamanho da partícula, através da equação de Stokes-Einstein.

Neste trabalho, as amostras de MVs foram diluídas com tampão PBS em frações de 500 µl. Cada frascção de vesículas diluídas foi analisada em triplicata a temperatura ambiente (~25°C), por 60s a 10 quadros por segundo, utilizando o equipamento Nanosight NS300 (NanoSight, Reino Unido). O programa utilizado para a captura e análise dos dados foi NTA, versão 2.3 build 0017.

4.9 GENOTIPAGEM DAS CEPAS DE *Trypanosoma cruzi*

As cepas de *T. cruzi* foram genotipadas segundo metodologia proposta por de Sá e colaboradores (2013). Este método consiste na análise do polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) do gene mitocondrial, citocromo oxidase - subunidade II (COII). Foi feito a extração de DNA total dos parasitos, subsequentemente a amplificação da região gênica que compreende um fragmento da COII e posteriormente a digestão dos produtos amplificados empregando-se a enzima de restrição AluI. Os fragmentos gerados foram analisados em um gel de poliacrilamida a 8% (solução de acrilamida/bis-acrilamida 29:1), corado pela prata e seguida pela fotodocumentação digital (FluorChem FC2, Cell Biosciences Austrália). A corrida foi feita em cuba de eletroforese vertical (Bio-Rad, EUA) com tampão TBE 1X a 60 V por 1 h.

4.9.1 Coloração com prata

Uma vez realizado o SDS-PAGE, os géis eram lavados por 5 minutos com água destilada e fixados em solução fixadora (etanol 10%; ácido acético 0.5%) por 10 min. Em seguida, foi colocado em solução de nitrato de prata (0.3%, p/v) por 10 min. Transcorrido este tempo, foi lavado três vezes por 3 min com água destilada e revelado em solução de revelação (NaOH 3% e formaldeído 0,3%) até o aparecimento das bandas. Após este passo foi lavado duas vezes com água

destilada por 3 min e a revelação foi interrompida com a adição da solução fixadora. Os géis eram armazenados na solução fixadora em um frasco vedado a 4°C por no máximo 3 dias. Todas as incubações foram feitas sob agitação.

4.10 LISE MEDIADA PELO COMPLEMENTO

Este ensaio mede a capacidade do soro humano normal de lisar os parasitos pela ação do sistema complemento. As concentrações de soro foram escolhidas experimentalmente antes da realização de qualquer experimento, baseado na diluição limite (mínima diluição de soro humano normal capaz de lisar os parasitos) e na determinação da IC50 ou seja utilizar a diluição de soro que lise aproximadamente 50% dos parasitos nos tempos preestabelecidos. Para fazer isso, foram feitos ensaios de lise mediado pelo complemento por diluição seriada do SHN.

O SHN foi diluído em HEPES ou RPMI em várias concentrações (50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 3,12%). Formas epimastigotas de *T. cruzi* em crescimento logarítmico foram centrifugadas a 2.000xg por 10 minutos, 4°C, lavadas duas vezes e suspensas em HEPES ou RPMI na concentração de 5×10^6 /ml. Os parasitos (5×10^5 em 100 µl) foram incubados juntamente com 100 µl de SHN diluído, em diferentes tempos de 10, 15 e 30 min a 37° C. Como controle negativo foi utilizado HEPES ou RPMI sem soro e 25% de SHN inativado por calor (56°C por 1 h). As reações foram paradas por intermédio da adição de 800 µl de HEPES ou RPMI gelado. Os parasitos foram quantificados em uma câmara de Neubauer sob o microscópio ótico com a objetiva de 40 X. A coloração com azul de tripano 0,2% e motilidade foram usadas para distinguir entre parasitos vivos e mortos. A contagem foi realizada com azul de tripano (SIGMA, 2010). Cabe mencionar que cada amostra foi contada pelo menos duas vezes.

4.10.1 Ativação das diferentes vias do sistema complemento

A via clássica e das lectinas do complemento são ambas dependentes de Ca^{2+} e Mg^{2+} , enquanto a via alternativa é dependente somente de Mg^{2+} . Para avaliar a atividade da via alternativa, parasitos foram incubados em SHN contendo 10 mM de um quelante de cálcio, EGTA e 7 mM de cloreto de magnésio (MgCl_2). Para a ativação da via das lectinas, os parasitos foram pré-incubados com 5% de SHN a 4°C durante 30 min sob agitação (para permitir a ligação das lectinas e ficolinas à

superfície do parasito, pré-ativando a via). Os parasitos foram recolhidos e em seguida incubados a 37°C na presença de soro com 10 mM EGTA/7 mM MgCl₂ (para o bloqueio da via clássica).

4.10.2 *Efeito das microvesículas na resistência a lise mediada pelo complemento*

Para estes ensaios, epimastigotas (5×10^5 em 100 µl) foram incubados em 100 µl de SHN com ou sem microvesículas (previamente purificadas e quantificadas) a 37°C, conforme foi descrito por Cestari e colaboradores (2012).

4.11 ENSAIOS DE INVASÃO A CÉLULAS VERO

4.11.1 *Ensaio de invasão usando o sistema de Transwell® (liberação simultânea de microvesículas e invasão celular)*

Placas de 24 poços contendo o inserto Transwell® com poros de 0,45 µm de diâmetro (Corning, EUA) foram usadas. As células Vero (1×10^5 células/poço) foram semeadas sobre lamínulas de vidro de 13 mm sobre a câmara inferior (por 16 h a 37°C com 5% de CO₂ para permitir a aderência). Uma vez transcorrido o tempo, as células Vero foram lavadas 2X com RPMI 1640 sem soro e então incubadas com 1×10^6 tripomastigotas metacíclicos (multiplicidade de infecção ou MOI=10:1). Ao mesmo tempo, as células THP-1 (1×10^6 células/poço) foram adicionadas à câmara superior ou seja no inserto Transwell® e foram incubadas sozinhas ou com tripomastigotas metacíclicos (MOI=10:1). Após uma hora, os insertos de Transwell® foram removidos e a infecção das células Vero continuou por mais 2 h a 37°C com 5% de CO₂. Transcorrido esse tempo, as células Vero foram lavadas, fixadas, coradas com Giemsa conforme descrito por Fernandes e colaboradores (2013). Finalmente, foram montadas entre lâmina e lamínula com a resina Entellan® (Merck). As lamínulas foram analisadas no scanner de lâminas, o microscópio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Alemanha), e as imagens foram obtidas utilizando o programa de captura automatizada Metafer 4/VSlide (Metasystems, Alemanha), objetiva 63X. O número de parasitos intracelulares foi determinado contando aleatoriamente pelo menos 300 células por lamínula em triplicata.

4.11.2 *Ensaio de invasão com MVs purificadas*

As células Vero foram semeadas sobre lamínulas de vidro de 13 mm em placas de 24 poços por 16 h a uma concentração de 1×10^5 células/poço. Depois disso, as células foram lavadas com RPMI 1640 sem soro e incubadas com MVs por 30 min a 37°C, 5% de CO₂. Após, os tripomastigotas metacíclicos foram adicionados e incubadas por 3 h com as células. Depois de 3 h, as células foram lavadas, coradas e analisadas como foi explicado acima.

4.12 ENSAIOS DE WESTERN BLOT

4.12.1 *Obtenção de extrato proteico total de tripomastigotas de Trypanosoma cruzi*

Um total de 1×10^8 tripomastigotas foram centrifugados a 4.000xg por 10 min a 4°C e lavados com tampão PBS gelado. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a lise desses parasitos ocorreu com uso de 100 µl de tampão de amostra para proteína. As amostras foram desnaturadas por 5 min a 95°C e passadas 15-20 vezes em uma seringa de 1 ml com agulha de 3,8 mm de diâmetro. As amostras foram mantidas a - 20°C até a sua utilização.

4.12.2 *Obtenção de extrato proteico total de células Vero*

O extrato total de células Vero foi obtido de um cultivo com 100% de confluência de uma garrafa T75. As células foram lavadas duas vezes com 5 ml de PBS. Após a lavagem, 2 ml de PBS foi adicionado e com auxílio de um raspador, as células foram removidas e recolhidas para tubos Falcon®. Em seguida, a suspensão de células foi centrifugada (200xg, 10 min, 4°C) e ressuspenso no tampão RIPA, que contém o cocktail de inibidores de proteases e fosfatases, MS-SAFE® (Sigma, EUA) a 1X (volume total de 100 µl). A amostra foi incubada por 30 min; cada 10 min foi passada em seringa. Por fim, a amostra foi centrifugada a 10.000xg, 20 min a 4°C e o sobrenadante contendo extrato proteico foi recuperado. Todo este processo foi realizado mantendo o material biológico em contato com gelo para manter uma temperatura baixa, o que inativa as enzimas proteolíticas liberadas da lise celular.

Posteriormente, DTT foi adicionado para uma concentração final de 5 mM e a amostra foi desnaturada à temperatura de 95°C por 5 min. A concentração de

proteína foi determinada usando o *kit* de Micro-BCA. A amostra foi mantida a - 20°C até a sua utilização.

4.12.3 *Preparação das MVs para eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)*

Uma quantidade de tampão de amostra para proteína 5X foi adicionado às MVs para atingir uma concentração final de 1X. As amostras foram desnaturadas por 5 min a 95°C e misturadas com uma ponteira. As amostras foram mantidas a - 20°C até a sua utilização.

4.12.4 *Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)*

Amostras de proteína foram submetidos à separação eletroforética em gel de SDS-PAGE 12% de poliacrilamida (solução de acrilamida/bis-acrilamida 29:1). 5 µl do extrato proteico total de parasitos (5×10^6 parasitos/canaleta) foi aplicada e no caso das MVs e extrato de células Vero, o volume equivalente a 2 µg e 40 µg de proteína respectivamente. A corrida foi realizada em cuba de eletroforese vertical em tampão SDS-PAGE. Fixou-se a voltagem em 50 V por 30-40 min para o gel de empilhamento e 80 V para o gel de separação por 2 h e 30 min. Em seguida, os géis foram corados com azul de Coomassie ou com nitrato de prata.

4.12.4.1 Coloração de géis SDS-PAGE com azul de Coomassie

Os géis foram corados pela imersão em solução de azul de Coomassie por mínimo de 3 h sob agitação e posteriormente descorados em uma solução contendo 30% de metanol e 10% de ácido acético.

4.12.4.2 Coloração de géis SDS-PAGE com nitrato de prata

Esta metodologia foi empregada para corar géis nos quais a proteína total de MVs foi separada. Os géis foram fixados em solução fixadora (etanol 40%; ácido acético 12% e formaldeído 0,02%) por no mínimo 1 h. Em seguida foram lavados duas vezes com etanol 30% por 10 min e uma vez com água por 20 min sob agitação. A sensibilização foi feita com tiosulfato de sódio 0,02% por 1 min e imediatamente cada gel foi lavado três vezes com água. Subsequentemente, a

coloração foi realizado com uma solução de nitrato de prata 0,1% em banho de gelo por 20 min. Após este tempo, os geis foram lavados cinco vezes com água e revelado em solução de revelação (carbonato de sódio 3% e formaldeído 0,05%) até o aparecimento das bandas. Após, foram lavados três vezes com água e a revelação foi interrompida com a adição de ácido acético 5% por 1 min. Por fim, o gel foi lavado três vezes com água por 10 min e armazenado com água a 4 °C por no máximo 3 dias. Durante o processo água ultrapura (18,2 MΩ.cm) foi usada e todas as incubações foram feitas sob agitação.

4.12.5 *Western blot*

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) no sistema de transferência semi-seca Trans-Blot SD (Bio-Rad, EUA) a 10 V por 40 min. A eficiência da transferência foi verificada corando a membrana com Ponceau-S, até que fosse possível a visualização de bandas; e imediatamente foi lavada brevemente com água destilada.

Logo após, a membrana foi incubada durante a noite sob agitação (assim como as demais incubações) a 4°C com solução de bloqueio. Transcorrido este tempo, foram realizadas três lavagens com PBST por 5 min e a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-GP82 (diluição 1:1.000 em PBST), soro humano normal (diluição 1:1.000 em PBST) ou soro de pacientes chagásicos (diluição 1:1.000 em PBST para extrato total de parasitos e diluição 1:500 com 0,5% p/v leite desnatado em PBST para MVs) durante 1 h 30 min a 37°C. Depois disso, a membrana foi lavada com PBS/T, três vezes por 5 min, e incubada por 1 h a 37°C com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase. Para ensaios com anti-GP82 o anticorpo secundário empregado foi anti-*mouse* na diluição 1:10.000 (Santa Cruz Biotechnology, EUA) e nos ensaios com soro humano, anti-humano na diluição 1:2.000 (Sigma). Logo depois, a membrana foi lavada com PBS/T, e logo depois com PBS como acima. Finalmente, foi revelada em fotodocumentador Amersham™ 600 (GE Healthcare, EUA) por quimioluminescência utilizando o kit Amersham™ ECL™ *Prime Western Blotting Systems* (GE Healthcare, EUA).

4.13 ENSAIOS DE ELISA (IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA): MEDIÇÃO DE CITOCINAS

Para a detecção de citocinas, o sobrenadante de 2×10^5 células THP-1 diferenciadas em macrófagos foi colhido, 24 h após tratamento com:

- 2,5 µg (proteína) de MVs derivadas da interação entre parasito (tripomastigotas metacíclicos) e células THP-1 ou somente células THP-1;
- 2×10^6 tripomastigotas metacíclicos (MOI=10:1);
- 10 µg/ml do extrato proteico total de tripomastigotas metacíclicos;
- 100 ng/ml de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*;
- ou células incubadas com o meio de cultivo (controle negativo).

A liberação de citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-6 e MCP-1/CCL2) foi avaliada usando o *kit* de *TMB ELISA Development* (PeproTech, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

4.13.1 Diferenciação das células THP-1 em macrófagos

Os monócitos THP-1 na fase exponencial de crescimento ($5-8 \times 10^5$ células/ml) foram utilizados para o ensaio de diferenciação para macrófagos. O protocolo de diferenciação foi adaptado de Lund *et al.* (2016).

Células THP-1 foram tratadas com 15 ng/ml (~25 nM) do agente indutor PMA diluído no meio RPMI. As células foram plaqueadas na densidade celular de 2×10^5 células/poço em placas de 24 poços e foram incubadas a 37°C, 5% CO₂, durante 48 h para promover a diferenciação. Após dois dias de exposição ao indutor, o meio com PMA foi removido e as células (diferenciadas) aderentes foram lavadas duas vezes com PBS estéril e uma vez com RPMI sem soro. Logo após, foi adicionado meio RPMI fresco e as células ficaram em repouso por 24 h, a 37 °C, 5% CO₂. Em seguida, as células THP-1 diferenciadas foram expostas aos tratamentos ou ao controle por 24 h. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C até utilização.

4.13.2 Obtenção do extrato proteico total de tripomastigotas metacíclicos

Tripomastigotas metacíclicos foram lavados três vezes por centrifugação a 4.000xg por 10 min a 4°C em PBS. Em seguida os parasitos foram ressuspensos em PBS (com cocktail de inibidores de proteases e fosfatases, MS-SAFE® a 1X) e

foram sonicados em um aparelho de ultrassom por dez ciclos de 1 min a 40 V em banho de gelo com intervalos de 30 s entre os ciclos de sonicações. Em seguida, o material sonicado foi centrifugado a 10.000xg durante 20 min, 4°C. O sobrenadante foi coletado e uma alíquota foi retirada para dosagem de proteínas com o *kit* de Micro-BCA. A amostra foi mantida a - 20°C até a sua utilização.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

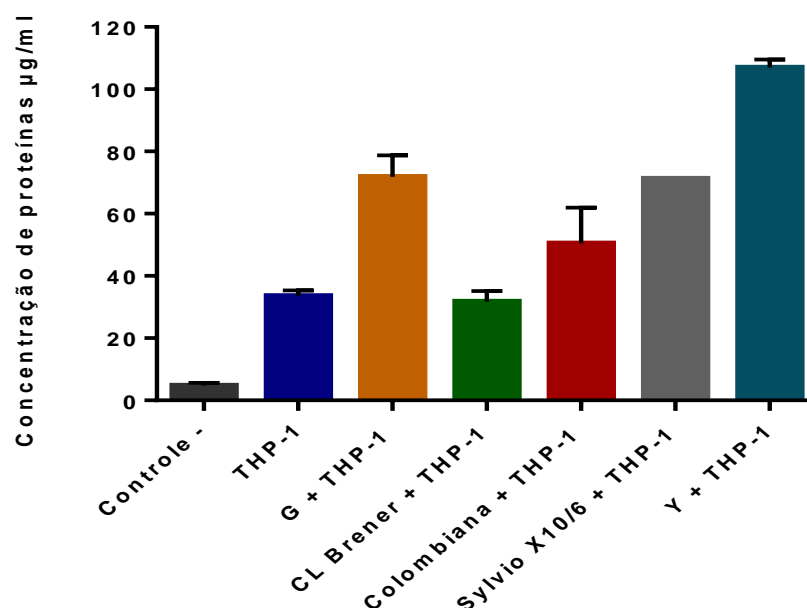
Os resultados são expressos como a média \pm desvio padrão. Para comparação dos valores das médias dos grupos, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para Múltiplas Comparações. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas usando o software *GraphPad Prism* (versão 6.0).

5 RESULTADOS

5.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS MVS DERIVADAS DA INTERAÇÃO DE DIFERENTES CEPAS DE *Trypanosoma cruzi* COM CÉLULAS THP-1

Primeiramente, demostramos que durante a interação de tripomastigotas metacíclicos de diferentes cepas de *T. cruzi* e células THP-1 na presença de CaCl_2 , há um aumento na liberação de MVs como é evidenciado pelo aumento de concentração de proteína detectada no *pellet* após ultracentrifugação (FIGURA 5). Cabe destacar que existe uma maior concentração de proteína em MVs derivadas das cepas Y, G e Sylvio X10/6 em contraste com Colombiana e clone CL Brener e as células THP-1 estimuladas com apenas 1mM de CaCl_2 .

FIGURA 5 – MVS DERIVADAS DA INTERAÇÃO DE DIFERENTES CEPAS E CLONES DE *Trypanosoma cruzi* E CÉLULAS THP-1

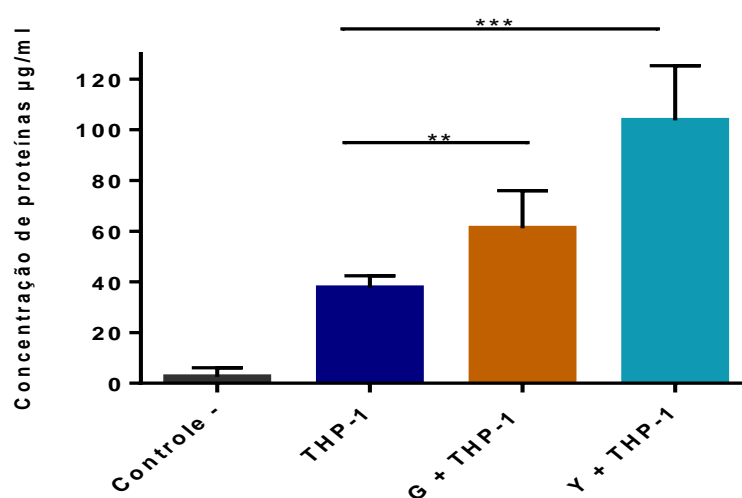


FONTE: O autor (2017).

NOTA: A interação de quatro cepas e um clone (CL Brener) de *T. cruzi* e células THP-1 têm diferentes níveis de produção de MVs. Tripomastigotas metacíclicos ($1 \times 10^7/\text{ml}$) foram incubados durante 1 h a 37°C com células THP-1 ($1 \times 10^6/\text{ml}$) na presença de 1mM de CaCl_2 para induzir a produção de MVs, MOI=10:1. Como controle, células THP-1 foram incubadas nas mesmas condições, mas sem o estímulo de parasitos. Outro controle corresponde ao meio RPMI após ultracentrifugação. Foi determinada a concentração de proteína detectada no *pellet* (MVs) após ultracentrifugação mediante o ensaio de proteína microBCA. Os dados representam a média \pm o desvio padrão de dois experimentos independentes.

Após a obtenção dos dados da FIGURA 5, foi decidido seguir no projeto estudando as MVs derivadas das cepas G e Y e após repetir os ensaios, foi visto que existe uma diferença significativa na produção de MVs das duas cepas, como é evidenciado pela diferenças nas concentrações de proteína das MVs (FIGURA 6); o conteúdo proteico das MVs derivadas da interação Y e células THP-1 é aproximadamente 3X mais elevado do que no caso de G.

FIGURA 6 – DIFERENÇAS NA PRODUÇÃO DE MVs DERIVADAS DA INTERAÇÃO DAS CEPAS G E Y E ÀS CÉLULAS THP-1



FONTE: O autor (2017).

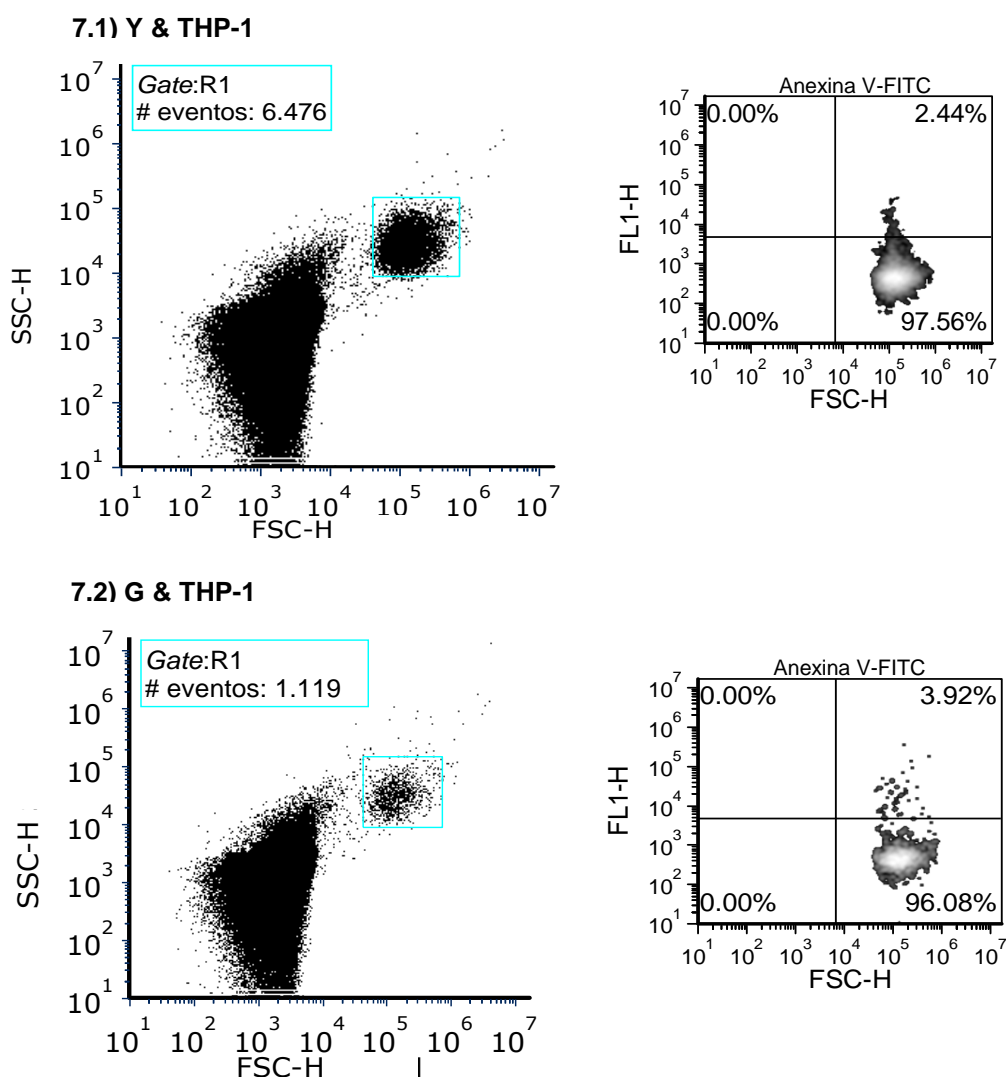
NOTA: As MVs isoladas da interação Y-células THP-1 têm uma concentração mais elevada de proteína do que as MVs provenientes de G e células THP-1. Tripomastigotas metacíclicos (1×10^7 /ml) foram incubados durante 1 h a 37°C com células THP-1 (1×10^6 /ml) na presença de 1mM de CaCl_2 para induzir a produção de MVs, MOI=10:1. Como controle, células THP-1 foram incubadas nas mesmas condições, entretanto sem o estímulo de parasitos. Outro controle corresponde ao meio RPMI após ultracentrifugação. Foi determinada a concentração de proteína detectada no pellet (MVs) após ultracentrifugação mediante o ensaio de proteína microBCA. Os valores apresentados correspondem as médias \pm o desvio padrão de pelo menos seis estudos independentes, **o valor-p <0,01 e ***o valor-p <0,001.

Foi verificada a pureza das formas tripomastigotas metacíclicos: no caso da cepa G foi $>97\% \pm 1.4\%$ e a cepa Y $>95\% \pm 1.3\%$. Também foram realizados ensaios de viabilidade das células THP-1 antes e imediatamente depois de incubação com tripomastigotas: antes de incubação, a viabilidade foi $>95\% \pm 2.2\%$ e após $>93\% \pm 1.9\%$, demonstrando que as MVs são liberadas a partir de células vivas e viáveis. A observação pelo microscópio ótico dos parasitos depois da incubação demonstrou que estavam altamente móveis, o que é normalmente observado nos metacíclicos vivos.

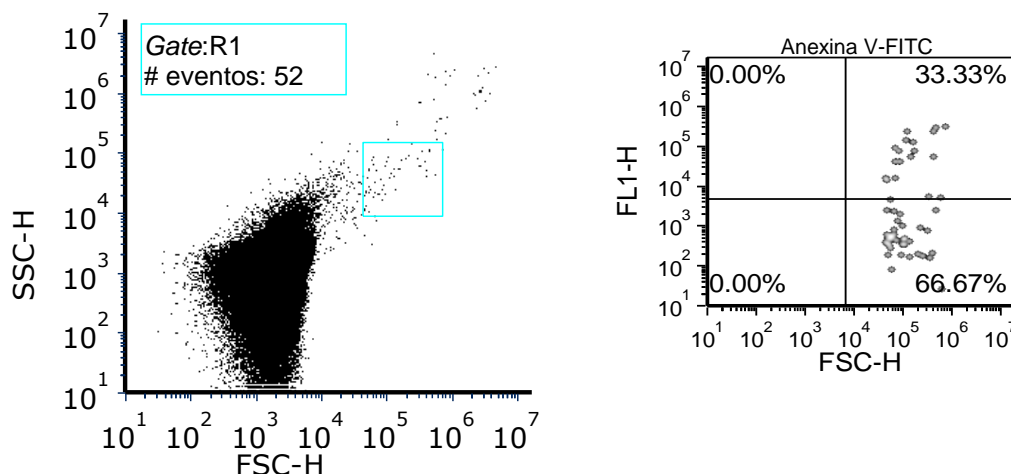
5.1.1 Análise de MVs pelo citometria de fluxo

A diferença na produção de MVs, isoladas da interação G-THP-1, Y-THP-1 e somente THP-1, associada a diferenças na concentração de proteína observada, foi refletida na variação no número de MVs (eventos) detectados por citometria de fluxo dessas condições. Isto é, a análise de citometria de fluxo de MVs revelou que um número mais elevado de MVs são liberadas durante a interação Y e células THP-1, em comparação a G-THP-1, evidenciado pelo número de eventos detectados por citometria de fluxo. Em constrate, no caso das células THP-1 incubadas sem parasitos, foi observada uma quantidade muito baixa de MVs (FIGURA 7).

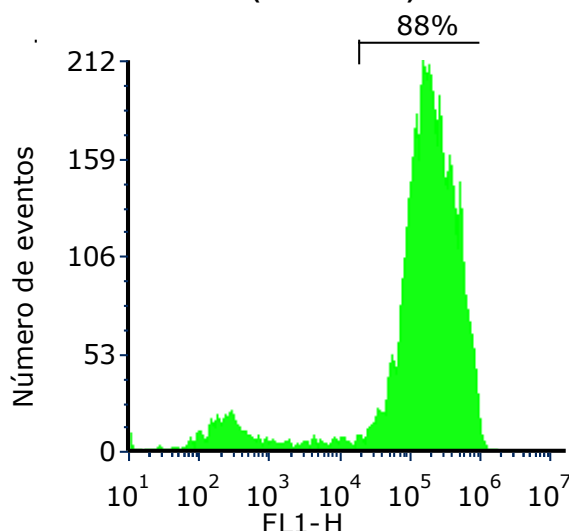
FIGURA 7 – APRESENTAÇÃO GRÁFICA E NÚMERICA DA ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DE MVS



7.3) THP-1



7.4) CONTROLE POSITIVA (ANEXINA-V) CÉLULAS THP-1 APOPTÓTICAS



FONTE: O autor (2017).

NOTA: **7.1-7.3)** As MVs, derivadas da interação de tripomastigotas metacíclicos das cepas G ou Y ($1 \times 10^7/\text{ml}$) foram incubados durante 1 h a 37°C com células THP-1 ($1 \times 10^6/\text{ml}$) em 1mM de CaCl_2 para induzir a produção de MVs. Como controle, células THP-1 foram incubadas nas mesmas condições, entretanto sem o estímulo de parasitos. As MVs isoladas foram quantificadas por citometria de fluxo em gráficos de pontos (“*dot plots*”) SSC vs FSC (termos do inglês *Side SCatter* e *Forward SCatter* representando os parâmetros de complexidade e tamanho das amostras, respetivamente), situado na esquerda. A área (“*gate*”) R1 representam as MVs; esta delimitação foi empregada após a análise dos parâmetros do tamanho e complexidade do tampão de ligação e das MVs não marcadas. A partir dos eventos delimitados com R1, foi realizada uma análise de fluorescência para determinar a população de MVs com exposição de PS na superfície; as MVs foram previamente marcadas com anexina V-FITC. Situado na direita, são gráficos de densidade (“*density plots*”) FL1 (fluorescência) vs FSC dessa análise. O número no quadrante superior direito é a porcentagem de eventos fluorescentes e no quadrante inferior direito está a porcentagem de eventos não fluorescentes **7.4)** Histograma da análise em citometria de fluxo de células THP-1 mortas marcadas com anexina V-FITC (controle positivo). A porcentagem de células positivas para anexina V é indicada no gráfico. Os dados apresentados foram adquiridos em logaritmos e são representativos de dois experimentos independentes.

Curiosamente, observamos que as MVs derivadas da interação parasito e THP-1 são principalmente negativos para anexina V.

Em conjunto, os dados da citometria de fluxo e da quantificação de proteínas

nas MVs demonstram que a formação de MVs aumenta durante a interação parasito e células THP-1.

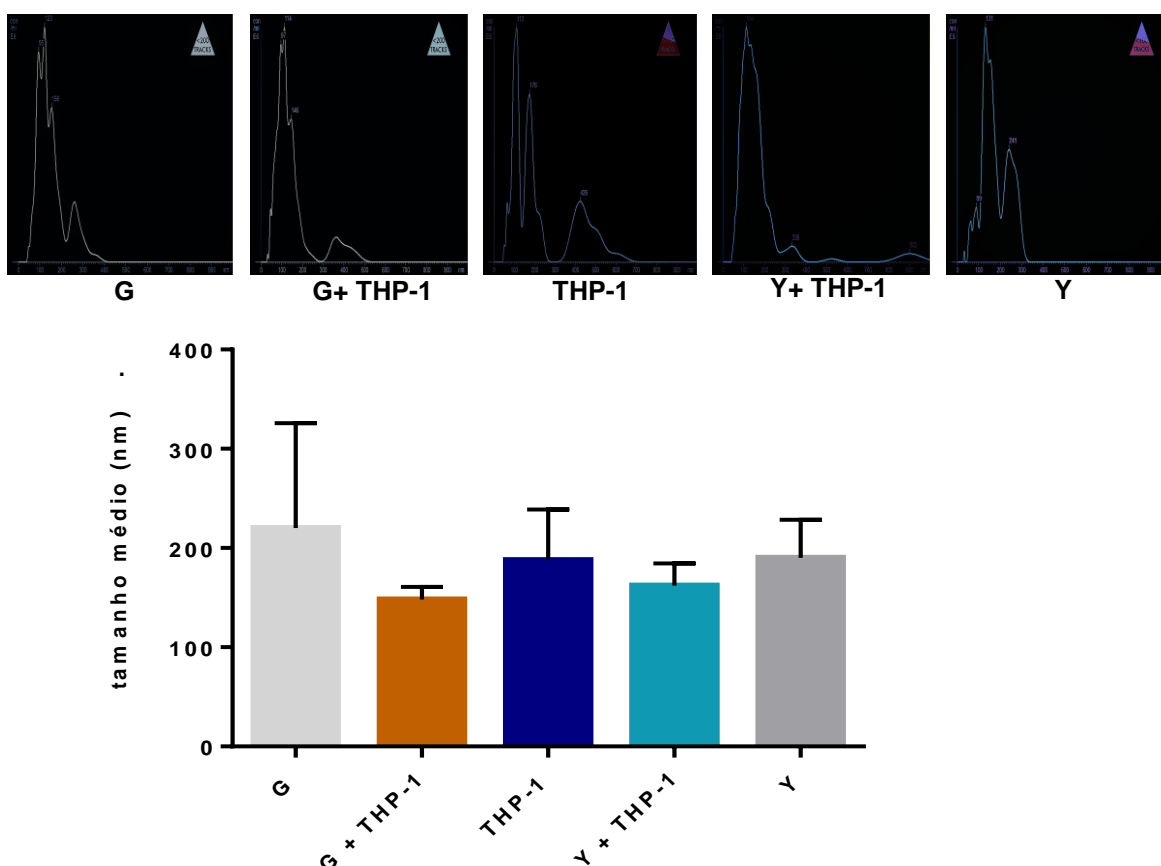
5.1.2 Análise de MVs pelo rastreamento de nanopartículas (Nanosight)

Através de uma colaboração com a Dra. Maria Galli de Amorim (Centro Internacional de Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center, Laboratório de Genômica Médica) conseguimos realizar a análise das MVs pelo Nanosight. Essa metodologia permite a quantificação e a obtenção das distribuições de tamanho de nanopartículas em suspensão através do estudo de seu movimento Browniano.

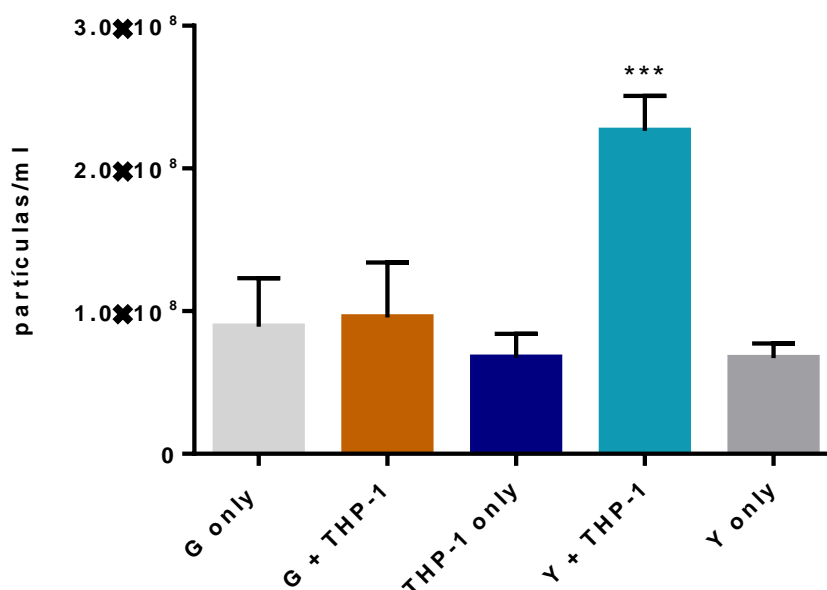
A análise pelo Nanosight mostrou que o tamanho médio das MVs de todas as amostras não variou significativamente (FIGURA 8.1). No entanto, o número de MVs derivadas da interação entre Y e THP-1 foi significativamente maior, em contraste com as outras amostras. Isto concorda com os dados obtidos da citometria de fluxo. Interessantemente, neste ensaio vimos que a liberação de MVs durante a interação G e THP-1 ou quando as células THP-1 ou parasitos foram incubados sozinhos não foram significativamente diferentes (FIGURA 8.2).

FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ANÁLISE DE MVS PELO RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS

8.1) Tamanho médio de MVs



8.2) Concentração de MVs



FONTE: O autor (2017).

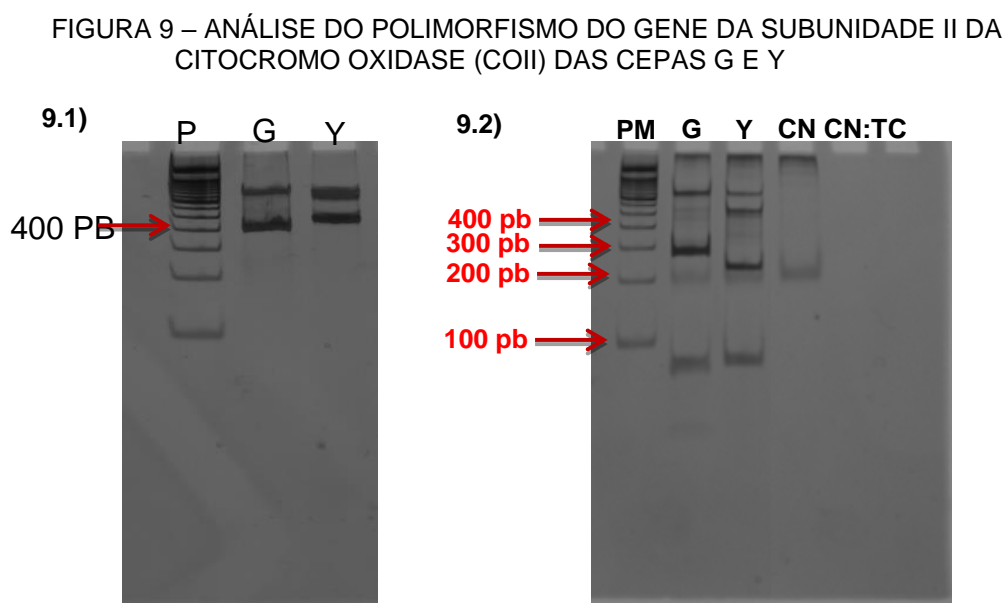
NOTA: **8.1)** Representação gráfica da análise pelo Nanosight demonstrando que o tamanho médio das MVs de todas as amostras é entre 150-200 nm. Situado na parte superior da figura, são gráficos representativos gerados diretamente do programa do Nanosight mostrando o perfil das distribuições de tamanho de MVs nas diferentes amostras. O eixo X é o tamanho (0-1000 nm) e o eixo Y, a concentração, partícula/ml. O triângulo no gráfico indica instâncias onde o número de rastreio ("tracks") concluídas foi <200. Isto refere ao número de vezes que uma determinada partícula foi rastreada em quadros consecutivos. Um número elevado de rastreios pode resultar em uma medição mais precisa do tamanho da partícula. Contudo, no caso de amostras com baixa concentração de partículas e as partículas são muito dispersas, como as MVs, é aceitável um número de rastreios mais baixo (tão baixo como 5). **8.2)** Gráfico mostrando a concentração de MVs em cada amostra. As MVs derivadas da interação Y-THP-1 produziu a maior concentração de MVs. As MVs, derivadas da interação de tripomastigotas metacíclicos das cepas G ou Y (1×10^7 /ml) foram incubados durante 1 h a 37°C com células THP-1 (1×10^6 /ml) em 1mM de CaCl_2 para induzir a produção de MVs. Como controle, células THP-1 ou parasitos foram incubadas sozinhos, porém sob as mesmas condições. Os dados representam as médias e desvio-padrões de dois experimentos independentes, ***o valor-p <0,001.

5.1.3 Genotipagem das cepas G e Y: Análise de polimorfismo do gene citocromo oxidase

Como foi explicado anteriormente, a espécie do *T. cruzi* possui uma estrutura genética que permite a subdivisão intraespecífica em seis grupos genéticos distintos ou DTUs, TcI a TcVI (ZINGALES *et al.*, 2009) que têm apresentado diferenças frente a distribuição geográfica e propriedades biológicas. A cepa G pertence ao DTU TcI, isolada de um gambá da região Amazônica brasileira e a cepa Y, isolada de humano no Brasil, está classificada como DTU TcII. Dado que foi observado que existe uma

diferença acentuada da liberação de MVs entre as cepas G (e THP-1) e Y (e THP-1), achamos importante realizar a genotipagem das cepas para confirmar a origem das mesmas.

O COII-RFLP permite a diferenciação entre DTU-I e DTU-II. A amplificação do gene COII por PCR dessas cepas revelou a banda esperada de ~400 pb (FIGURA 9.1). A digestão dos fragmentos amplificados com AluI gerou o perfil de RFLP mostrado na FIGURA 9.2.



FONTE: O autor (2017).

NOTA: **9.1)** Produtos de amplificação por PCR do gene COII das cepas G e Y. **9.2)** Padrão de RFLP obtida por AluI digestão do COII das cepas G e Y resolvido em geis de poliacrilamida 8% corado pelo nitrato de prata. PM = padrão molecular de 100 pb (Invitrogen, EUA), CN = controle negativo (*mix* da digestão sem DNA adicionado), CN:TC = controle negativo tampão de carregamento.

A digestão de COII revelou uma banda esperada de ~300 bp para DTU-I e uma banda esperada de ~250 bp para DTU- II, diferenciando as duas cepas. O fragmento de ~80 pb é observada para todas as DTUs de *T. cruzi* (DE SÁ *et al.*, 2013). Bandas inespecíficas de maior de 600 pb foram detectadas.

5.2 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DAS MICROVESÍCULAS NA LISE MEDIADA PELO SISTEMA COMPLEMENTO

Primeiramente, foram realizados ensaios de lise mediado pelo complemento por diluição seriada do SHN com culturas de epimastigotas de *T. cruzi* G e Y na fase logarítmica de crescimento para determinar a concentração de SHN capaz de matar

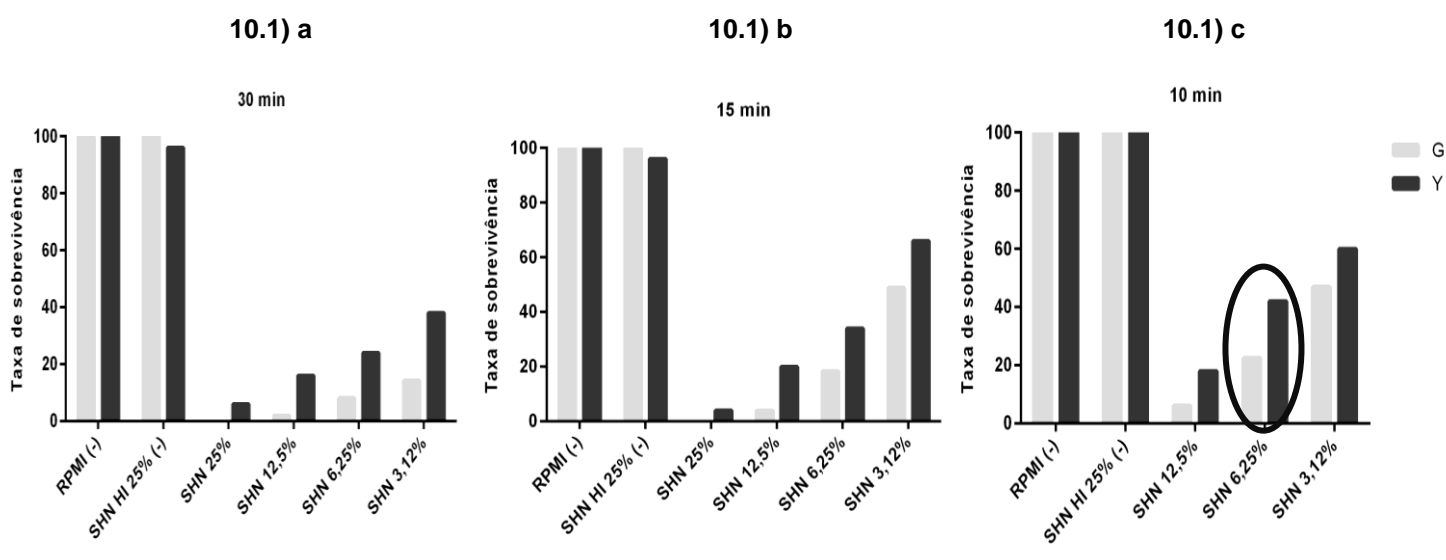
aproximadamente 50% dos parasitos para ambas cepas, assim poder usar a mesma concentração de SHN para demais ensaios de lise em experimentos mais adiante. As formas epimastigotas foram usadas como modelo já que essa forma é sensível à lise do complemento e pode ser cultivada *in vitro*.

Foi avaliado diferentes concentrações de soro (50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%) e diferentes tempos de incubação (30 min, 15 min e 10 min) (FIGURA 10). Após estudar os resultados, resolvemos que para tal alíquota de SHN avaliada (que chamamos SHN do doador 1), parasitos incubados em 6,25% de SHN durante 10 min a 37°C é apropriada dado que nestas condições <50% epimastigotas de ambas cepas foram mortos Figura 10.1. Concentrações de SHN a 50% provocaram a lise total dos parasitos.

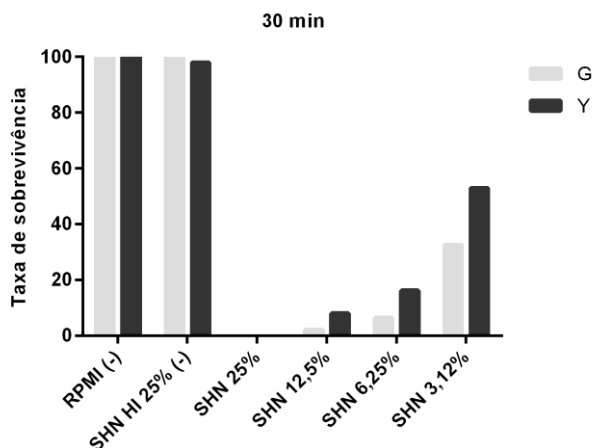
Os dados também mostram que a cepa Y é mais resistente à lise mediada pelo complemento. No entanto, também realizamos os ensaios de lise utilizando uma alíquota diferente de SHN (denotado aqui como doador 2) apenas para confirmar essa capacidade diferencial de ser lisadas pelo complemento apresentadas por ambas cepas (FIGURA 10.2), e foi observado que a cepa Y é mais resistente à lise enquanto a cepa G.

FIGURA 10 – ENSAIOS DE LISE PELO COMPLEMENTO POR DILUIÇÃO SERIADA DE SORO HUMANO NORMAL

10.1) Ensaios do complemento: SHN de doador 1



10.2) Ensaios do complemento: SHN de doador 2



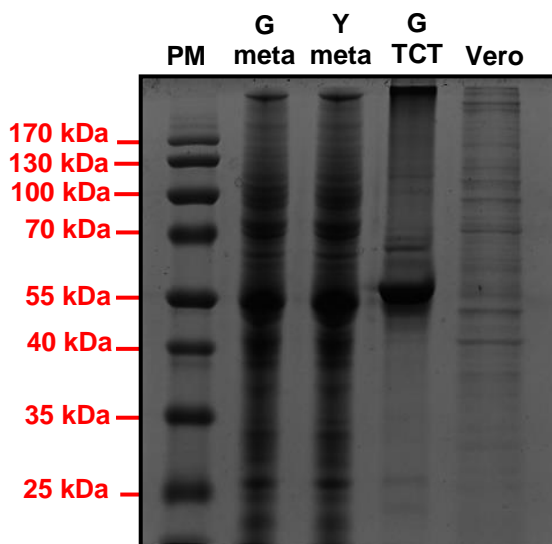
FONTE: O autor (2017).

NOTA: **10.1)** Representação gráfica dos ensaios de lise mediada pelo complemento em *T.cruzi* por diluição seriada do SHN com diferentes tempos de incubação (30 min, 15 min e 10 min). **10.2)** Representação gráfica da lise pelo complemento utilizando uma alíquota de SHN de outro doador. A cepa Y é mais resistente à lise mediada pelo complemento enquanto a G. Os resultados são mostrados em %. **10.1a-b** e **10.2** representam a média de um ensaio feito em duplicata e **10.1c**, a média de pelo menos dois experimentos realizados em duplicata. HI=soro inativado.

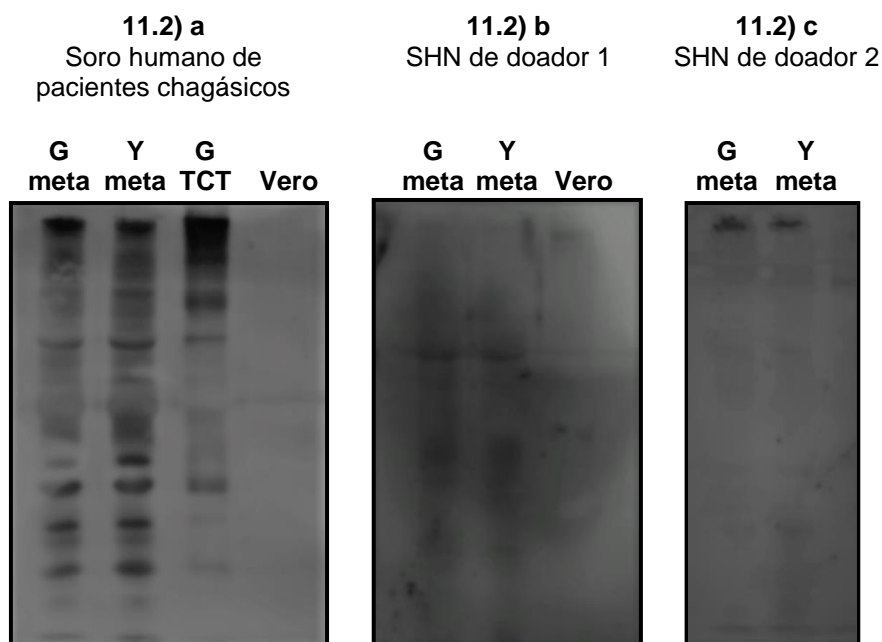
Ademais, foram feitos experimentos de *Western Blot* para testar a reatividade de SHN usado nos ensaios de lise contra o extrato protéico total de tripomastigotas metacíclicos (forma infectiva para o homem) de *T. cruzi* (FIGURA 11). Os resultados deste ensaio comprovaram que o SHN apresenta reatividade significativamente mais baixa contra o extrato de proteína de *T.cruzi* do que o soro de pacientes chagásicos. Cabe ressaltar que esta baixa reatividade do SHN contra os antígenos de *T. cruzi* era de esperar, pois sabe-se que o SHN contém níveis baixos de anticorpos anti- α -galactosil, que reconhecem epítomos α -galactosil abundante nas glicoproteínas na superfície de *T. cruzi* (ALMEIDA *et al.*, 1991).

FIGURA 11 – *WESTERN BLOT*: REATIVIDADE DE SORO HUMANO COM EXTRATO TOTAL DE *Trypanosoma cruzi*

11.1) Extrato total de *T. cruzi* separado por SDS-PAGE



11.2) *Western Blot* do soro humano contra extratos proteicos totais de *T. cruzi*



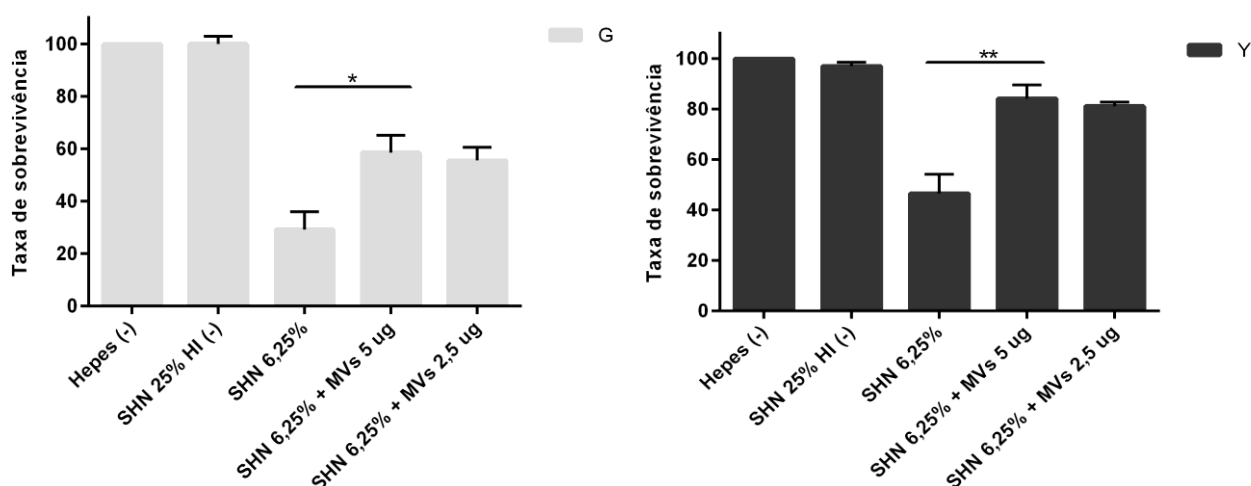
FONTE: O autor (2017).

NOTA: **11.1)** Imagem de gel de poliacrilamida, 12%, corado com azul de Coomassie de extratos proteicos totais de *T. cruzi* e de células Vero. Lisado total de 5×10^6 parasitos e 40 µg do extrato de proteína total de células Vero foram empregados. Ao lado esquerdo é representado os pesos moleculares do marcador. **11.2)** Imagens do *Western Blot* do extrato total de *T. cruzi*, contra o soro humano de pacientes chagásicos, **11.2a** e soro humano normal **11.2b-c**. O extrato de proteína total de células Vero foi usado com o controle negativo e o extrato de TCT (outra forma infectiva de *T. cruzi*), foi incluso como um tipo de controle positivo. Diluição de soro 1:1.000, anti-humano 1:2.000. As imagens foram adquiridas usando o fotodocumentador Amersham™ 600. Os resultados mostrados são representativos de três experimentos realizados independentes. Meta=tripomastigotas metacíclicos. TCT= tripomastigotas sanguíneas.

5.2.1 Análise do efeito de MVs, isoladas da interação *Trypanosoma cruzi*-células mamíferas, sobre a atividade do sistema complemento

Foi investigado o efeito das MVs sobre a atividade do complemento. Uma quantidade de MVs equivalente a 5 µg e 2,5 µg de proteínas (total de MVs) foi adicionada ao soro humano normal e realizamos comparativamente ensaios de lise mediada pelo complemento na presença e ausência de MVs. Vimos que as MVs conferiram proteção da ação do complemento aos parasitos das duas cepas a concentrações de soro de 6,25% (FIGURA 12).

FIGURA 12 – ENSAIOS DA LISE MEDIADA PELO COMPLEMENTO NA PRESENÇA DE MVS

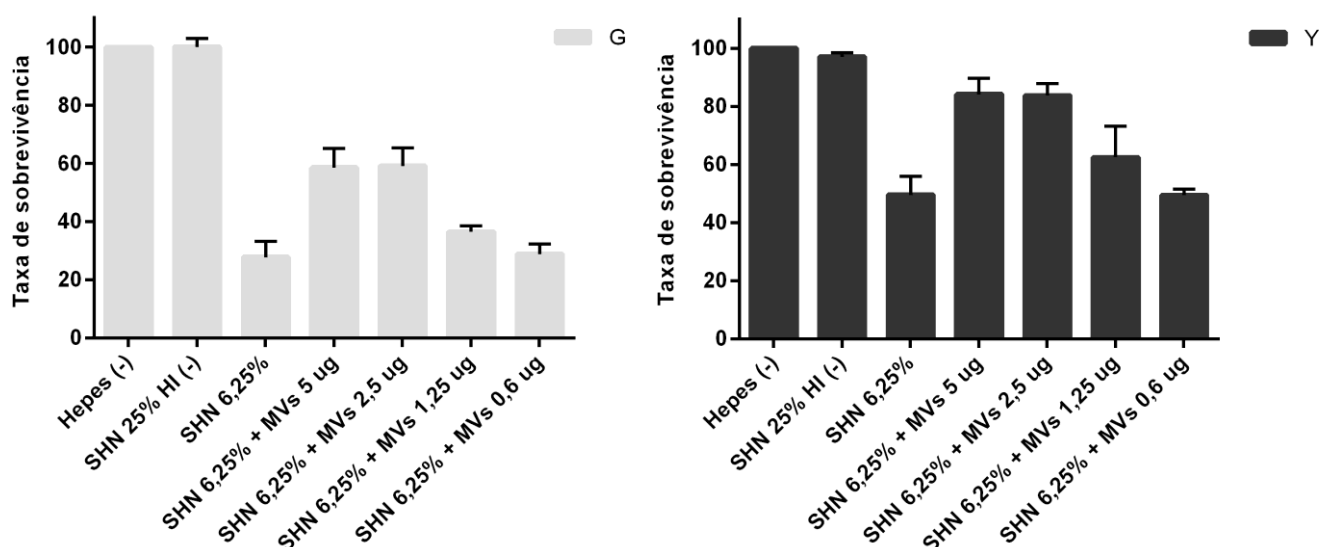


FONTE: O autor (2017).

NOTA: **12)** Apresentação gráfica dos ensaios da lise mediada pelo complemento na presença de MVs. Os dados mostram que as MVs conferem resistência aos parasitos da lise mediada pelo complemento. Os resultados são mostrados em % e os valores correspondem as médias e desvio-padrões de pelo menos dois experimentos independentes feitos em duplicata, *o valor-p <0,05 e **o valor-p <0,01. HI=soro inativado.

No entanto, como não observamos uma diferença entre 5 µg e 2,5 µg, foram feitos ensaios com concentrações inferiores a 2,5 µg para poder detectar diferenças na capacidade de inibir a lise (maneira dose-dependente) (FIGURA 13).

FIGURA 13 – ENSAIOS DA LISE MEDIADA PELO COMPLEMENTO UTILIZANDO DIFERENTES QUANTIDADES DE MVS



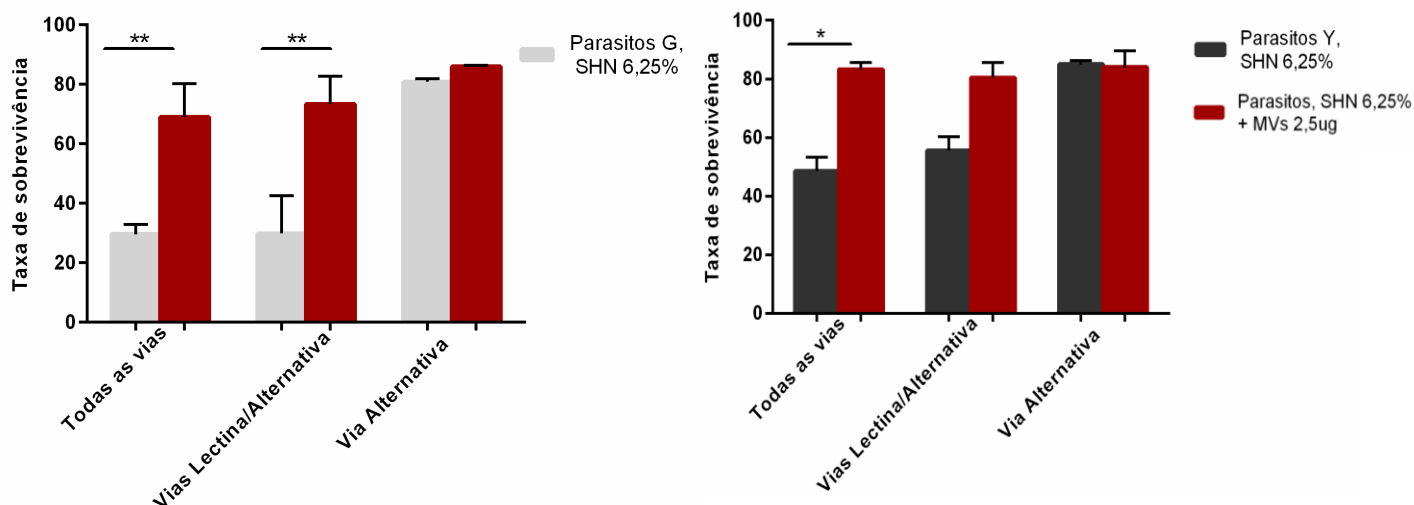
FONTE: O autor (2017).

NOTA: **13)** Apresentação gráfica dos ensaios da lise mediada pelo complemento na presença de diferentes quantidades de MVs. Os dados mostram que a adição de MVs ao soro humano inibiu a lise de *T. cruzi* de uma forma dose-dependente. Os resultados são mostrados em % e os valores correspondem as médias e desvio-padrões de pelo menos dois experimentos independentes feitos em duplicata. HI=soro inativado.

Dado que não foi observada uma diferença significativa na capacidade de reduzir a lise pelo complemento entre 5 μ g e 2,5 μ g, usamos a menor concentração de MVs equivalente a 2,5 μ g de proteína nos seguintes ensaios.

Uma vez determinada que as MVs inibem a ação do sistema complemento, foram realizados ensaios para avaliar a via ou as vias do complemento inibidas pelas MVs. Os resultados demonstram que as MVs estão inibindo principalmente a via das lectinas (FIGURA 14), confirmando os dados achados por Cestari *et al.* (2012).

FIGURA 14 – ENSAIOS DA LISE MEDIADA PELO COMPLEMENTO: EFEITO DAS MVS SOBRE AS DIFERENTES VIAS DO SISTEMA COMPLEMENTO

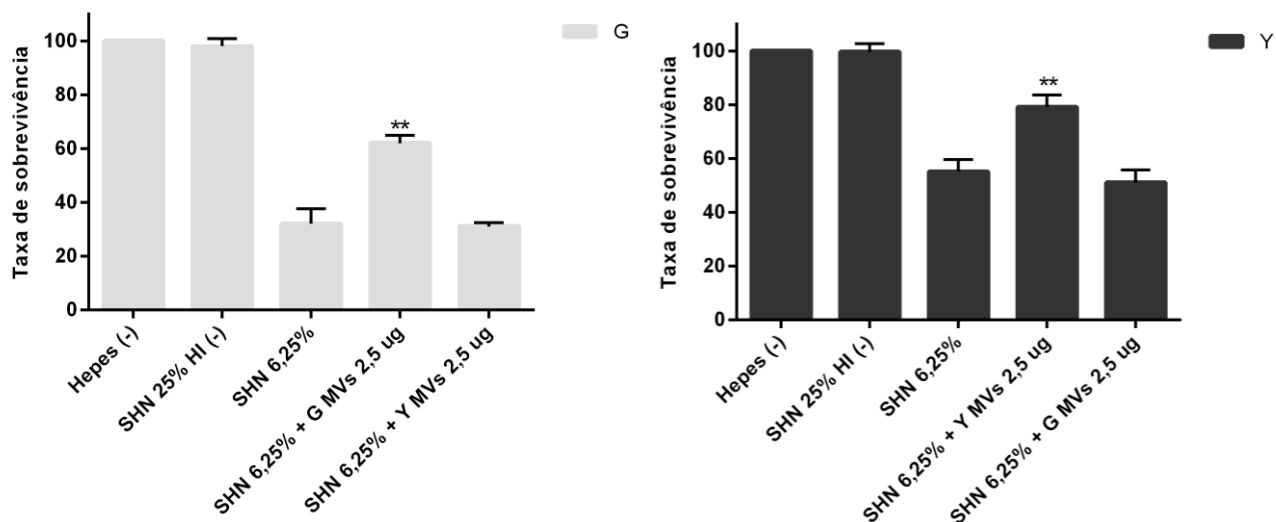


FONTE: O autor (2017).

NOTA: **14)** Análise gráfica dos ensaios da lise mediada pelo complemento onde foi avaliado o efeito das MVs sobre as diferentes vias do complemento. Os dados são mostrados em % e os valores correspondem as médias e desvio-padrões de pelo menos dois experimentos independentes feitos em duplicata, *o valor-p <0,05 e **o valor-p <0,01. HI=soro inativado.

Finalmente, decidimos avaliar a capacidade das MVs, isoladas da interação de uma cepa e células THP-1, para inibir a lise pelo complemento dos parasitos da outra cepa. Observamos um dado muito interessante; as MVs provenientes de uma cepa não foram capazes de inibir a lise mediada pelo complemento dos parasitos da outra cepa (FIGURA 15).

FIGURA 15 – ENSAIOS DA LISE MEDIADA PELO COMPLEMENTO: EFEITO DAS MVS DE UMA CEPA SOBRE OS PARASITOS DE OUTRA CEPA



FONTE: O autor (2017).

NOTA: **15)** Representação gráfica dos ensaios da lise mediada pelo complemento onde foi investigado o efeito das MVs de uma cepa sobre os parasitos de outra cepa. Segundo nossos dados, as MVs de uma cepa não foram capazes de inibir a lise mediada pelo complemento dos parasitos da outra cepa. Os dados são mostrados em % e os valores representam as médias e desvio-padrões de pelo menos dois experimentos independentes feitos em duplicata, **o valor-p <0,01. HI=soro inativado.

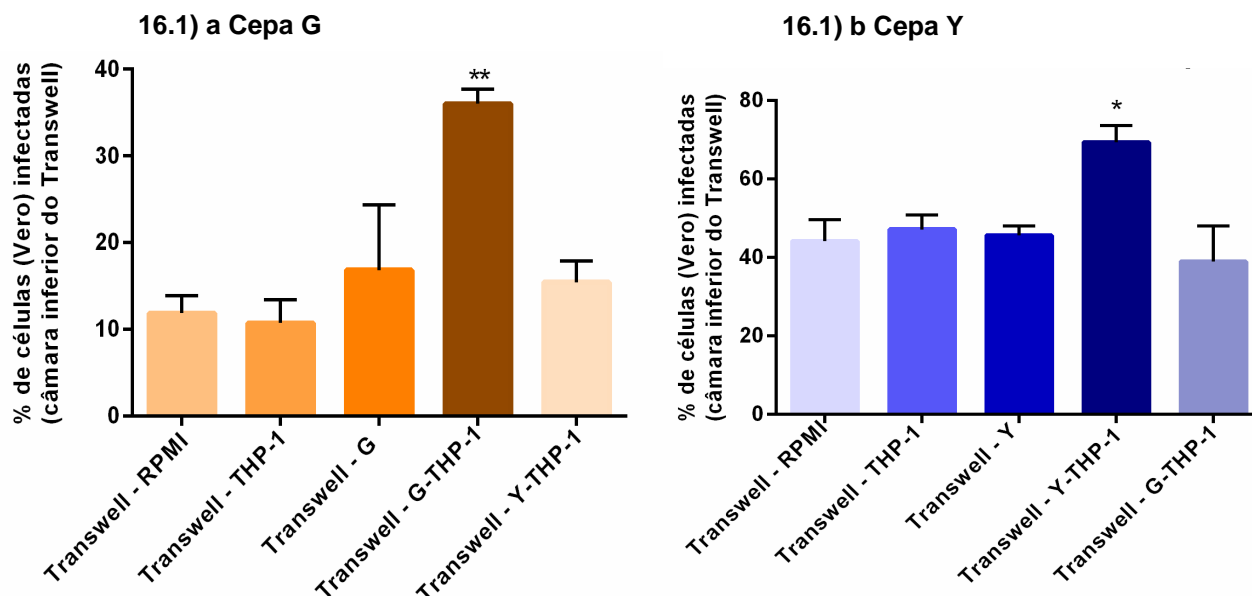
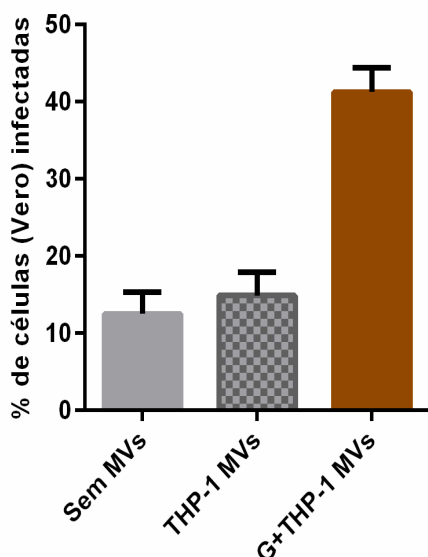
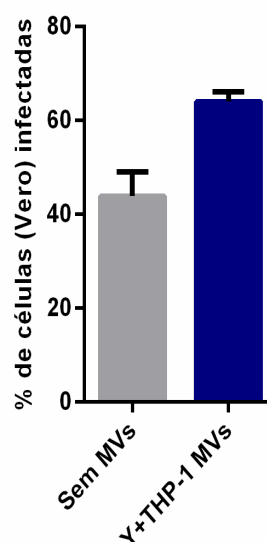
Em conjunto, estes dados indicam que as MVs inibem o sistema do complemento através da interferência principalmente da via das lectinas, mas o efeito indica ser específico para cada cepa.

5.3 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DAS MICROVESÍCULAS NO PROCESSO DE INVASÃO DE FORMAS METACÍCLICAS DE *Trypanosoma cruzi* NAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS

Neste trabalho, foi verificado que as MVs provenientes da interação *T. cruzi* - THP-1 são capazes de aumentar a taxa de invasão do parasito em células Vero. Isto foi demonstrado tanto nos ensaios de Transwell® (FIGURA 16.1) como a adição de MVs, previamente purificadas, as células Vero no momento do ensaio (FIGURA 16.2). Vale destacar que o ensaio de Transwell® é uma metodologia útil para analisar se MVs liberadas (neste caso da interação *T. cruzi*-THP-1) poderiam simultaneamente aumentar a entrada de parasito em células vizinhas. Portanto, o parasito junto com células THP-1 foram colocados no inserto de Transwell® enquanto as células Vero na câmara inferior.

Por outro lado, observamos que as MVs provenientes dos parasitos de uma cepa só foi capaz de influenciar a invasão dos parasitos da mesma cepa, porém não parece ter um efeito sobre o processo de invasão da outra cepa. Cabe mencionar que os dados também demonstram que a cepa Y apresenta uma maior taxa de invasão do que a cepa G.

FIGURA 16 – ENSAIOS DE INVASÃO: O PAPEL DE MVS NA TAXA DE INVASÃO

16.1) Ensaios de invasão: Transwell®**16.2) Ensaios de invasão: MVs purificadas****16.2) a Cepa G****16.2) b Cepa Y**

FONTE: O autor (2017).

NOTA: **16.1)** Representação gráfica dos ensaios de invasão através da técnica de Transwell®. As células Vero (1×10^5) foram semeadas na parte inferior de uma placa de Transwell® e foram incubadas com tripomastigotas metacíclicos, MOI=10:1. Simultaneamente, as células THP-1 (1×10^6) foram incubadas na câmara superior sozinhas ou com tripomastigotas metacíclicos (MOI=10:1). Também foi incluído controles, nos quais foram incubados somente os parasitos. Os dados demonstram que as MVs liberadas da interação parasito e THP-1 são capazes de simultaneamente induzir um aumento

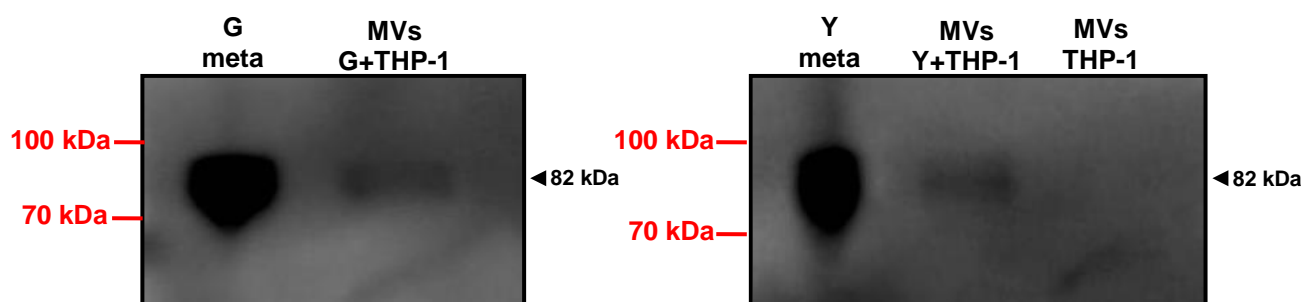
da invasão de tripomastigotas metacíclicos nas células vizinhas, neste caso células Vero. Todavia as MVs de uma cepa não parece ter um efeito sobre a invasão da outra cepa. Os dados são mostrados em % e os valores correspondem as médias e desvio-padrões de dois experimentos independentes feitos em duplicata ou triplicata, *o valor-p <0,05 e **o valor-p <0,01. O eixo X representam o que foi posto no inserto do Transwell® ou seja a câmara superior e o eixo Y a porcentagem de células infectadas **16.2)** Representação gráfica dos ensaios de invasão onde as células Vero foram pré-incubadas com uma quantidade de MVs purificadas equivalente a 2,5 µg de proteína (total de MVs) antes da adição de tripomastigotas metacíclicos. Foram usadas MVs purificadas da interação parasito-THP-1, as MVs provenientes de somente células THP-1 foram usadas como um controle. Neste ensaio foi visto que as MVs purificadas são capazes de aumentar a taxa de invasão do parasito. Os dados são mostrados em % e representam a média e barras de erro de um ensaio feito em duplicata. Os ensaios de invasão foram realizados durante 3 h a 37°C.

5.4 DETERMINAÇÃO DOS COMPONENTES DAS MICROVESÍCULAS QUE PODERIAM SER ANTIGÊNICOS CONTRA SORO DE PACIENTES CHAGÁSICOS E AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE GP82 EM MICROVESÍCULAS LIBERADAS DURANTE A INTERAÇÃO PARASITO-CÉLULA HOSPEDEIRA

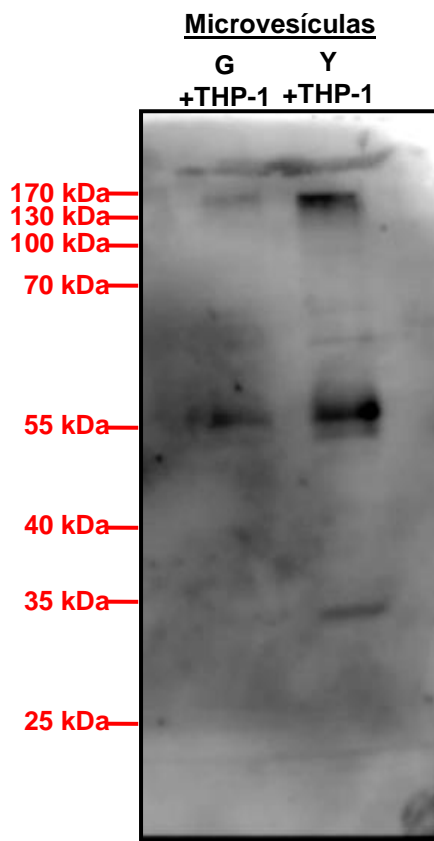
Já vimos que existem diferenças na quantidade de MVs liberadas durante a interação das diferentes cepas de *T. cruzi* com células hospedeiras (FIGURA 5 e 6), e claro, foi comprovado que essas MVs estão envolvidas nos mecanismos de evasão da ação do sistema imune inata e da invasão celular do parasito. Nosso próximo passo foi analisar as proteínas associadas às MVs. Considerando o papel importante de GP82 na interação inicial do parasito com as células hospedeiras, resolvemos analisar por *Western Blot* se as MVs isoladas da interação tripomastigotas metacíclicos (cepas G e Y) e THP-1 também carregam antígenos parasitários como GP82 utilizando o anticorpo monoclonal 3F6 (anti-GP82) (YOSHIDA, 2006). Os resultados dos ensaios de *Western Blot* demonstram que as MVs de *T. cruzi*-THP-1 carregam a proteína GP82, no entanto está ausente nas MVs das células THP-1 (FIGURA 17).

FIGURA 17 – WESTERN BLOT: AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS A MVs

17.1) *Western Blot*: anti-GP82 contra proteína total de MVs



17.2) *Western Blot* do soro de pacientes chagásicos contra proteína total de MVs



FONTE: O autor (2017).

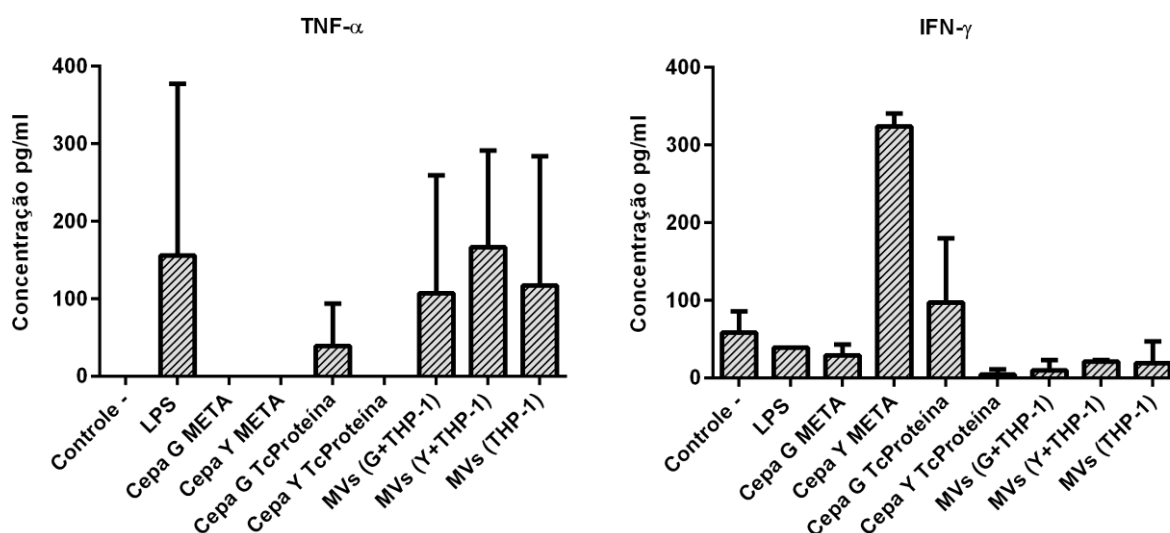
NOTA: **17.1)** Imagens do *Western Blot* do extrato total de tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* e a proteína total de MVs, contra anti-GP82 (1ª anti-GP82 1:1.000; 2ª anti-mouse 1:10.000). **17.2)** Imagens do *Western Blot* mostrando que as MVs derivadas da interação parasito-THP-1 contêm proteínas reconhecidas pelo soro de pacientes chagásicos. Dois microgramas da proteína total de MVs e extrato proteico total de 5×10^6 parasitos foram usados, (1ª soro 1:500 com 0.5% leite desnatado, 2ª anti-humano 1:2.000). Ao lado esquerdo de cada figura é representado os pesos moleculares do marcador e ao direito da figura 17.1, o peso esperado para GP82. As imagens foram adquiridas usando o fotodocumentador Amersham™ 600. Os resultados mostrados são representativos de pelo menos dois experimentos realizados independentes. Meta=tripomastigotas metacíclicos.

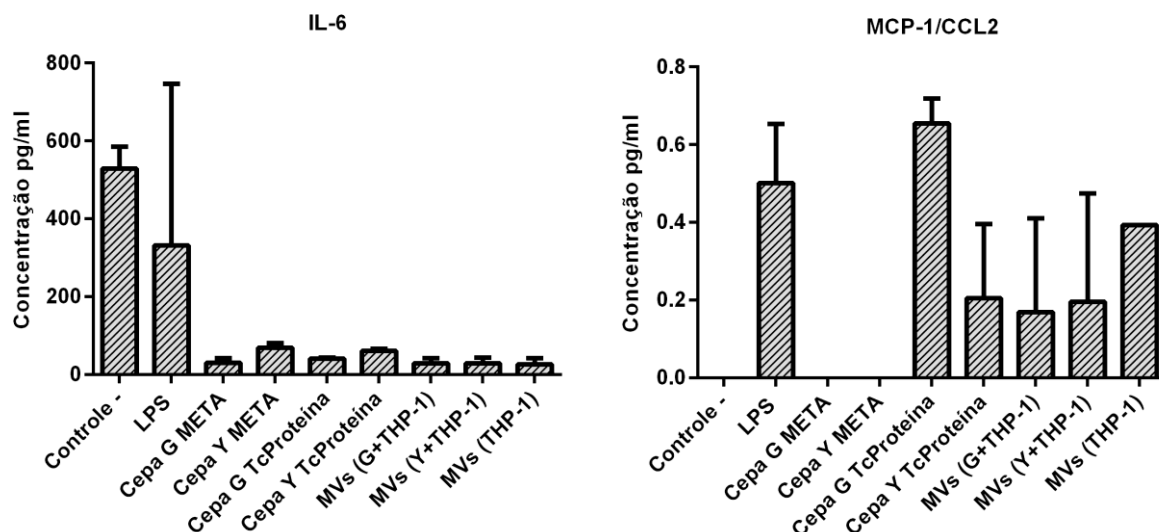
Nós hipotetizamos que MVs de diferentes cepas poderia ter antígenos parasitários distintos que seriam reconhecidos por soro de pacientes chagásicos. Os resultados dos ensaios de *Western Blot*, de fato, revelaram diferenças nas proteínas entre as MVs de G-THP-1 e Y-THP-1 reconhecidas pelo soro de pacientes da doença de Chagas (FIGURA 17).

5.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DAS MVS NA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM MACRÓFAGOS (CÉLULAS THP-1 DIFERENCIADAS)

Como observamos neste trabalho as vesículas liberadas durante a interação *T. cruzi*-célula hospedeira são enriquecidas com moléculas parasitárias (antígenos), nós raciocinamos então que estas MVs poderiam induzir a produção de citocinas em células da imunidade inata, agravando a inflamação e assim ter um efeito sobre a patogênese da doença de Chagas. Portanto, células THP-1 foram diferenciadas para macrófagos durante 48 h com PMA; as células diferenciadas foram tratadas com o estímulo de 2,5 µg de MVs e controles por 24 h e finalmente, a produção de citocinas (pro-inflamatórias IFN-γ, TNF-α, IL-6; e a quimioatratante MCP-1/CCL2), foi determinada no sobrenadante das células mediante ELISA. Contudo, nossos resultados não permitiram fazer conclusões, pois os níveis de citocinas foram similares para as células incubadas com MVs e sem este estímulo (controle negativo). A produção de citocinas aumentou apenas levemente quando as células foram incubadas com os controles positivo (LPS e parasitos) (FIGURA 18).

FIGURA 18 – PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR MACRÓFAGOS (CÉLULAS THP-1 DIFERENCIADAS)





FONTE: O autor (2017).

NOTA: Macrófagos (células THP-1 diferenciadas) foram estimuladas com 2,5 µg (proteína) de MVs, derivadas da interação entre as formas metacíclicas de *T. cruzi* e células THP-1, ou células THP-1 incubadas sozinhas, durante 24 h. Lipopolissacarídeo (100 ng/ml) de *E. coli*, META das cepas G e Y (MOI 10:1) e extrato proteico total do parasito (10 µg/ml) foram os controles positivo. Controle negativo refere à células incubadas apenas com o meio de cultura. A medição de citocinas foi feita usando um *kit* comercial de ELISA (PeproTech, EUA). Os dados representam a média de um ensaio feito em duplicata (nos casos quando as MVs foram adicionadas) e triplicata (as demais amostras). META= tripomastigotas metacíclicos. TcProteína=extrato proteico total do parasito. LPS=Lipopolissacarídeo.

6 DISCUSSÃO

Uma vez dentro do hospedeiro, os tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* encontram-se os primeiros mecanismos do sistema imune inato do hospedeiro como células de defesa (incluindo macrófagos, monócitos, linfócitos) e o sistema complemento. Deste modo, os parasitos empregam várias estratégias para subverter o sistema imune do hospedeiro para poder invadir rapidamente uma grande variedade de células hospedeiras. Na presente dissertação, nós estudamos um dos mecanismos envolvidos na evasão da ação do sistema imune empregado pelo *T. cruzi*: a liberação de MVs.

A liberação de vesículas durante a interação Trypanosoma cruzi-célula hospedeira

Primeiramente mostramos que a liberação de MVs é estimulada durante a interação de tripomastigotas metacíclicos em contato com células sanguíneas e que este fenômeno é reduzido quando ou células ou parasitos são incubados sozinhos. Isto corrobora com dados de outras pesquisas (FIGURA 5-8) (CESTARI *et al.*, 2012; RAMIREZ *et al.*, 2016). Cestari e colaboradores (2012) mostraram *in vitro* e *in vivo* que há um aumento na liberação de MVs durante a interação entre tripomastigotas metacíclicos e diferentes linhagens de células (mamíferas) sanguíneas. Mais recentemente, Ramirez e colaboradores (2016) demonstraram que todos os estágios de *T. cruzi* são capazes de induzir a liberação de MVs durante a interação com células hospedeiras, contudo uma maior concentração de MVs foi detectada quando as formas infectivas (tripomastigotas metacíclicos e sanguíneos) estavam em interação com as células hospedeiras. Neste estudo células THP-1 foram utilizadas como modelo de célula sanguínea. É uma linhagem de monócitos (célula sanguínea do sistema imune inato) amplamente utilizada em estudos de MVs (MACKENZIE *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2010; CESTARI *et al.*, 2012; RAMIREZ *et al.*, 2016; SAHA, *et al.*, 2016).

Tanto as células quanto os parasitos liberam MVs durante a interação (RAMIREZ *et al.*, 2016) e como sabe-se que a liberação de MVs aumenta no início da apoptose (PAP *et al.*, 2009) nós achamos importante confirmar que as MVs são liberadas de células e parasitos viáveis, verificando a viabilidade das mesmas antes e depois da interação. Isto demonstra que a liberação de MVs é independente da

apoptose e corrobora com observações feitas anteriormente pelo nosso grupo (CESTARI *et al.*, 2012). Neste trabalho a viabilidade de células, que foram incubadas com parasitos por diferentes tempos (0-60 min) foi avaliada pela análise de citometria de fluxo. As células foram marcadas com anexina V e iodeto de propídio e foi determinado que a porcentagem de células apoptóticas não aumentou significativamente após 60 min (CESTARI *et al.*, 2012).

Por outro lado, apesar de que em outros trabalhos foi relatado que MVs incluindo MVs provenientes da interação *T. cruzi*-hospedeiro são geralmente positivas para anexina V, indicando a exposição da PS na superfície, (GONZALEZ *et al.*, 2009; CESTARI *et al.*, 2012; FUJII *et al.*, 2015; RAMIREZ *et al.*, 2016), neste trabalho observamos que as MVs derivadas da interação de *T. cruzi* e células mamíferas eram principalmente negativas para anexina V (FIGURA 7). Este fenômeno têm sido observado também em outros modelos de estudo (JIMENEZ *et al.*, 2003; CONNOR *et al.*, 2010) e alguns pesquisadores sugerem que o uso de anexina para a detecção de MVs pode não ser preciso por várias razões incluindo: uma exposição de PS insuficiente na superfície de MVs ou condições experimentais inadequadas (CONNOR *et al.*, 2010; GYÖRGY *et al.*, 2011). Ainda a marcação com anexina V é amplamente aceita como um marcador para MVs (GYÖRGY *et al.*, 2011).

Apesar de não termos sido capazes de detectar a marcação de anexina V na superfície das vesículas isoladas, através de análises por Nanosight demonstramos que esta população de vesículas é em grande parte MVs. Tais análises mostraram que o diâmetro das MVs obtidas era majoritariamente superior a 100 nm o que coincide com o tamanho conhecido de MVs (FIGURA 8) (YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015). Além disso, análises por microscopia eletrônica apontam que as vesículas que brotam da membrana plasmática de *T. cruzi* e células THP-1 são de tamanho >100 nm (CESTARI *et al.*, 2012; BAYER-SANTOS *et al.*, 2013). Cabe mencionar que Nogueira e colaboradores (2015) também mostraram através de Nanosight que o tamanho das vesículas liberadas por *T. cruzi* é >100 nm (NOGUEIRA *et al.*, 2015).

Não observamos diferença significativa entre o tamanho médio das MVs liberados por ambas cepas, como foi observado previamente (NOGUEIRA *et al.*, 2015). Embora interessante vimos que há um aumento maior de MVs durante a interação dos metacíclicos da cepa Y com células THP-1 do que a cepa G, evidenciado pela análises de quantificação do conteúdo proteico das MVs, citometria

de fluxo e Nanosight (FIGURA 7-8). Cabe destacar que os tripomastigotas metacíclicos da cepa Y foram previamente caracterizados por ter uma capacidade infectiva maior enquanto da cepa G (YOSHIDA, 2006). Curiosamente, comparações recentes do conteúdo genético de diferentes DTUs de *T. cruzi*, revelaram que existem variações no número de cópias de famílias multigênicas entre as diferentes DTUs demonstrando diferenças entre as cepas. TcII (como cepa Y) tem mais cópias de famílias multigênicas como trans sialidase, MASPs e mucinas do que a cepa G (TcI) (DE PABLOS e OSUNA, 2012).

Neste trabalho associamos o número de MVs com a concentração de proteína das mesmas como foi utilizado em outros trabalhos (SILVERMAN *et al.*, 2010; TROCOLI-TORRECILHAS *et al.*, 2012; NOGUEIRA *et al.*, 2015; RAMIREZ *et al.*, 2016). Outros autores tem usado o conjunto total de VEs de um determinado número de células para ensaios funcionais (SZEMPRUCH *et al.*, 2016).

A liberação de vesículas é um evento geral durante a interação parasito-célula hospedeira: um mecanismo de evadir a resposta imune do hospedeiro

Em um trabalho de nosso grupo (CESTARI *et al.*, 2009), foi demonstrado que no início da infecção a via das lectinas está principalmente envolvida na ativação do complemento. As lectinas e ficolinas presentes no soro reconhecem rapidamente moléculas padrões na superfície de *T. cruzi* no estágio epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos ativando o complemento. Sabe-se que as MVs ligam à superfície de parasito e inibem a ação catalítica de C3 convertase das vias clássica e de lectinas impedindo a lise do patógeno (CESTARI *et al.*, 2012). Como consequência da inibição de C3 convertase, a produção de C3b é reduzida, é assim as MVs poderiam diminuir a ocorrência de fagocitose mediada pela opsonização com C3b. Outro benefício do aumento na liberação de MVs pelo parasitos é que possivelmente isto pode permitir que o parasito remova as moléculas do complemento depositando na membrana plasmática (PILZER *et al.*, 2005; AL-NEDAWI *et al.*, 2009).

Um de nossos focos foi estudar cepas de *T. cruzi* que apresentam diferenças na susceptibilidade à lise mediada pelo sistema complemento e em estudos feitos em outros trabalhos (CESTARI *et al.*, 2008; CESTARI e RAMIREZ, 2010) e em nosso laboratório, foi demonstrado que existe uma diferença da sensibilidade à ação

do sistema complemento entre as cepas G e Y. Na presente dissertação vimos que parasitos das cepas G e Y são lisados pelo complemento e que existe diferenças na susceptibilidade à lise pelo complemento (FIGURA 10). Também, houve uma diferença na capacidade dos soros de lisar. Para os ensaios de complemento foi usado principalmente o soro do doador 1 e utilizando este soro determinamos que IC50 para a cepa G foi 3,12% e a cepa Y, 6,25% (FIGURA 10). No entanto, optamos por usar 6,25% para os ensaios de complemento de ambas cepas porque achamos melhor realizar os ensaios com a mesma concentração de SHN, facilitando assim a análise dos dados. Experimentos com MVs purificadas, mostraram que as MVs inibem a lise do complemento de maneira dose-dependente e que o mecanismo de evasão à lise está associado principalmente à inibição da via das lectinas corroborando o trabalho de Cestari e colaboradores (2012) (FIGURA 13-14). Para parasitos da cepa G a resistência à lise aumentou de 28% até 59% no ensaio de lise com 6,25% de SHN por 10 min. O mesmo ocorreu com parasitos da cepa Y onde este aumento foi de 50% a 80%. Este fenômeno já tinha sido demonstrado por Cestaria e colaboradores (2012) apenas com parasitos da cepa Sylvio X10/6 que corresponde a classificação DTU TcI e agora mostramos com cepas pertencentes às DTUs TcI e TcII.

Os experimentos de lise foram realizados com as formas epimastigotas, assim como foram feitos por outros autores (NORRIS *et al.*, 1998; CESTARI *et al.*, 2012), que são as formas usadas para entender os mecanismos de ativação e resistência. No entanto, quando realizamos ensaios com formas metacíclicas não conseguimos obter uma lise consistente dos parasitos para poder avaliar o efeito das microvesículas. A lise por uma hora foi de apenas 20%, o que impediu ver o efeito das microvesículas. Condições experimentais estão sendo aprimoradas para validar os dados nas formas metacíclicas para poder realizar os ensaios de lise a futuro.

A liberação de vesículas por outros tripanossomatídeos como um mecanismo para evadir a resposta imune de hospedeiro tem sido demonstrado. Recentemente, foi demonstrado que o proteoma das VEs de *Trypanosoma brucei*, parasito extracelular e agente etiológico da doença do sono ou tripanossomíase africana, contém um número de proteínas implicadas na virulência e persistência do parasito no interior do hospedeiro (SZEMPRUCH *et al.*, 2016). No hospedeiro mamífero este parasito é encontrado circulando no sangue e no espaço extracelular dos tecidos.

De modo inato, o soro humano e de outros primatas contêm factores líticos para eliminar estes parasitos, todavia, algumas subespécies expressam fatores de virulência que lhes permite neutralizar essa resposta imune. Estes autores mostraram que as VEs de *T. brucei* são capazes de fundir-se com a membrana plasmática dos tripanossomas vizinhos, resultando na transferência e interiorização de lipídios e proteínas das VEs. Desse modo *T. b. rhodesiense*, infectiva para humano, é capaz de transferir moléculas de virulência para *T. b. brucei* (não infectiva para humano), permitindo assim a sua evasão da imunidade inata humana. Observaram também que as VEs fundem com os eritrócitos de mamíferos, alterando as propriedades físicas da membrana dos mesmos e os autores postulam que esta poderia ser a causa da anemia observada em mamífero infectados com este parasito.

O papel das VEs originadas de *Leishmania* spp., parasito protozoário causador da leishmaniose, também tem sido associado à modulação da resposta imune do hospedeiro mamífero. Silverman e colaboradores (2008 e 2010) demonstraram através da análise proteômica e microscopia eletrônica que este parasito (estágio no inseto vetor, cultivado *in vitro*) libera VEs e estes são capazes de modular respostas imunitárias (SILVERMAN *et al.*, 2008; SILVERMAN *et al.*, 2010). Dentro do hospedeiro mamífero *Leishmania* spp., são encontradas no interior dos macrófagos e um estudo das proteínas liberadas de macrófagos infectados, foram identificadas proteínas parasitárias envolvidas na evasão do sistema imune, por exemplo protease de superfície GP63 (GOMEZ *et al.*, 2009). Sabe-se que em *Leishmania* spp. GP63 bloqueia a lise mediada pelo complemento através da neutralização de C3b (BRITTINGHAM *et al.*, 1995).

A liberação de vesículas é um evento geral durante a interação parasito-célula hospedeira: estão envolvidas nos mecanismos de invasão

Neste trabalho, vimos também que as MVs induzem um aumento de invasão por *T. cruzi* em células de mamíferos (FIGURA 16) como foi visto em outros trabalhos (CESTARI *et al.*, 2012; RAMIREZ *et al.*, 2016). Os mecanismos exatos pelos quais as MVs mediam a invasão permanecem desconhecidos. Contudo como foi explicado anteriormente, sabe-se que as MVs derivadas da interação *T. cruzi*/THP-1 contêm TGF- β (CESTARI *et al.*, 2012) e foi visto anteriormente que esta

citocina tem um papel no processo de invasão (MING *et al.*, 1995), sugere-se que as MVs carreando TGF- β poderiam facilitar a invasão provavelmente ativando uma via de sinalização para promover a invasão de *T. cruzi* (CESTARI *et al.*, 2012).

Cabe destacar o estudo realizado em *Trichomonas vaginalis*, parasito protozoário extracelular associada à vaginite e cervicite. Foi visto que as VEs derivadas deste parasito pode aumentar a citoaderência do parasito para células epiteliais humanas (TWU *et al.*, 2013), entretanto as VEs contêm factores específicos de cada cepa que influencia a ligação de maneira diferente. As VEs das cepas altamente cito-aderentes induzem a forte ligação do parasito, enquanto que as VEs das cepas que têm uma capacidade baixa de aderência induzem uma ligação menos forte.

Outros patógenos, incluindo parasitos vermes, fungos, vírus e bactérias, também liberam VEs durante a infecção (CAMPOS *et al.*, 2015; YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015; MARTI e JOHNSON, 2016).

Além disso nós demonstramos que as MVs purificadas de *T. cruzi*-célula hospedeira carregam proteínas de superfície do parasito como GP82 e que soro de pacientes chagásicos possuem anticorpos que reagem com antígenos dessas MVs (FIGURA 17). Isto corrobora com observações feitas pelo nosso grupo em um trabalho anterior, no qual foi visto que o soro de pacientes em diferentes estágios da doença de Chagas reage com antígenos nas MVs isoladas da interação das formas tripomastigotas e células hospedeiras. Todavia, este soro não reagiu com as MVs das formas não infectivas (RAMIREZ *et al.*, 2016). Estes dados bem como o fato de que vesículas de outros patógenos também contêm antígenos, fornecem evidências sobre o potencial de vesículas como biomarcadores de diagnóstico de várias doenças. Isto é, a presença de VEs e a caracterização da sua composição poderia prover informações sobre o curso da doença. Curiosamente, houve diferenças nas proteínas detectadas das MVs provenientes de diferentes cepas; isto precisa ser investigado mais para avaliar uma gama de soro de outros pacientes e incluir outras cepas.

Outro dado interessante e talvez surpreendente foi o fato de que nós observamos que as MVs isoladas da interação de parasitos da cepa G (Tcl) com células hospedeiras não tinha um efeito sobre o processo de invasão e inibição da resposta imune dos

parasitos da cepa Y (TcII) e *vice versa* (FIGURA 15-16). Isto tal vez seja o dado mais fascinante do presente trabalho, mostrando que as cepas têm mecanismos de inibição independentes e os componentes de MVs poderiam ser diferentes. Esse achado deve ser avaliado mais utilizando microscopia para observar as interações entre as MVs de um parasito sobre os parasitos de outra cepas; os mecanismos exatos envolvidos neste fenômeno são desconhecidos. Em um estudo realizado por Nogueira e colaboradores (2015), no qual VEs de uma cepa de *T. cruzi* foram colocadas em contato com células mamíferas previamente infectadas com parasitos de outra cepa (de outra DTU) e liberação de citocinas foi avaliada (NOGUEIRA *et al.*, 2015). No entanto, neste estudo, a liberação de citocinas variou bastante e não foi possível fazer uma dedução. Neste trabalho também tentamos avaliar a capacidade das MVs para induzir a liberação de citocinas, mas nossos resultados foram inconclusivos (FIGURA 18). Este ensaio terá de ser repetido.

7 CONCLUSÕES

Por fim, é seguro dizer que a liberação de fatores de virulência por meio das vesículas para o espaço extracelular por parasitos é agora aceito como um fenômeno que tem um significado biológico e vários grupos têm descrito que estas vesículas exercem efeitos nas células hospedeiras incluindo células do sistema imune (SILVERMAN *et al.*, 2010; TWU *et al.*, 2013; BAYER-SANTOS *et al.*, 2013; GARCIA-SILVA *et al.*, 2014; NOGUEIRA *et al.*, 2015; SZEMPRUCH *et al.*, 2016). Por conseguinte, patógenos utilizam as VEs como veículos para comunicação intercelular e manipulação do hospedeiro. É possível que estas vesículas estejam atuando como mensageiros para preparar as células hospedeiras para invasão interagindo com os componentes da superfície celular ou ser internalizadas e de alguma forma preparar a célula hospedeira para a entrada do parasito.

Nesta dissertação, vimos que as vesículas provenientes da interação *T. cruzi*-células THP-1 carregam proteínas envolvidas em processos durante a interação parasito-célula hospedeira como GP82, membro da superfamília transialidase, implicada na adesão e invasão de células (RAMIREZ *et al.*, 1993; ATAYDE *et al.*, 2004; YOSHIDA, 2006) contêm componentes reconhecidos por anticorpos presentes no soro de pacientes chagásicos. Também, comprovamos que as MVs são capazes de modular a resposta imunitária principalmente nos mecanismos de evasão à lise pelo complemento e na invasão celular. Embora nossos dados indiquem que este fenômeno é específico para cada cepa. Acreditamos que o estudo dos mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro empregado por patógenos como *T. cruzi* permitirá o avanço no entendimento do processo de infecção e desenvolvimento da doença. Neste sentido esta dissertação contribui, mostrando novos aspectos do efeito das MVs durante a interação *T. cruzi*-célula hospedeira.

8 PERSPECTIVAS

- Obter a análise proteômica das MVs derivadas da interação dos parasitos das cepas G e Y com células THP-1 com o objetivo de identificar as proteínas nas diferentes MVs e determinar se existe diferença no conteúdo proteico das mesmas;
- Utilizar técnicas de microscopia para estudar a interação das MVs de uma cepa sobre os parasitos de outra cepa, possivelmente no momento da invasão;
- Repetir a avaliação da capacidade das MVs de modular a expressão de citocinas em macrófagos, como modelo células THP-1 diferenciadas;
- Utilizando alíquotas de soro de uma vasta gama de pacientes chagásicos determinar se os componentes de microvesículas que podem ser antigênicos e desta maneira ser de potencial interesse como diagnóstico ou prognóstico da doença.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSOHN, I. A. Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 117-121, 1998.
- ALBERTTI, L. A. G. *et al.* Role of host lysosomal associated membrane protein (LAMP) in *Trypanosoma cruzi* invasion and intracellular development. **Microbes and Infection**, v. 12, p. 784-789, jun., 2010.
- ALMEIDA, I. C. *et al.* Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti- α -galactosyl antibodies. **The Journal of Immunology**, v. 146, n. 7, p. 2394-2400, abr., 1991.
- ALMEIDA, I. C. *et al.* Lytic anti-x-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemistry Journal**, v. 304, p. 793-802, 1994.
- AL-NEDAWI, K.; Meehan, B.; Janusz, R. Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression. **Cell Cycle**, v. 8, n. 13, p. 2014-2018, jul., 2009.
- ANDREWS, N. W. *et al.* A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell**, v. 61, n. 7, p. 1277-1287, jun., 1990.
- ANONYMOUS. Recommendations from a satellite meeting. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 429-432, 1999.
- ARGOLO, A. M. *et al.* Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. **Imperial Novo Milênio**. 2008.
- ATWOOD, J. A. *et al.* The *Trypanosoma cruzi* proteome. **Science**, v. 309, p. 473-476, jul., 2005.
- ATAYDE, V. D. Molecular basis of non-virulence of *Trypanosoma cruzi* clone CL-14. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 851-860, mar., 2004.
- BAJ-KRZYWORZEKA, M. *et al.* Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 55, n. 7, p. 808-818, jul., 2006.
- BARBOSA, P. R. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. **International Journal of Cardiology**, v. 112, n. 1, p. 132-133, set., 2006.
- BARTHOLOMEU, D. C. *et al.* Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (MASP) family of the human pathogen

Trypanosoma cruzi. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 10, p. 3407-3417, mar., 2009.

BASTIDA, E. *et al.* Tissue factor in microvesicles shed from U87MG human glioblastoma cells induces coagulation, platelet aggregation, and thrombogenesis. **Blood**, v. 64, n. 1, p. 177-184, jul., 1984.

BAYER-SANTOS, E. *et al.* Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 2, p. 883-897, fev., 2013.

BAYER-SANTOS, E. *et al.* Characterization of the small RNA content of *Trypanosoma cruzi* extracellular vesicles. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 193, n. 2, p. 71-74, fev., 2014.

BELLINI, M. F. *et al.* Biologic and Genetics Aspects of Chagas Disease at Endemic Areas. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, 2012.

BERMUDEZ, J. *et al.* Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1-16, 2016.

BONNEY, K.M. Chagas Disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat?. **Parasite**, v. 21, n. 11, mar., 2014.

BRITTINGHAM, A. *et al.* Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **The Journal of Immunology**, v. 155, n. 6, p. 3102-3111, set., 1995.

BUSCAGLIA, C. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 229-236, fev., 2006.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, n. 3, p. 93-100, jun., 1964.

CAMPOS, J. H. Extracellular vesicles: role in inflammatory responses and potential uses in vaccination in cancer and infectious diseases. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, ago., 2015.

CARRERA-SILVA, E. A.; Gea, S.; Guiñazú, N. Cytokines, key players to turn on/off the anti-*Trypanosoma cruzi* innate defense mechanisms. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, p. 594-604, 2011.

CARDOSO, M.; Reis-Cunha, J. L.; Bartholomeu, D. C. Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. **Frontiers in Immunology**, v. 6, jan., 2016.

CESTARI, I. *et al.* Complement C2 receptor inhibitor trispanning confers an increased ability to resist complement-mediated lysis in *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 9, p. 1276-83, nov., 2008.

CESTARI, I. *et al.* Role of early lectin pathway activation in the complement-mediated killing of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular Immunology**, v. 47, n. 2-3, p. 426-37, dez., 2009.

CESTARI, I.; Ramirez, M.I. Inefficient complement system clearance of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enables resistant strains to invade eukaryotic cells. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, p. e9721, 2010.

CESTARI, I. *et al.* *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 4, p. 1942-1952, fev., 2012.

CESTARI, I. *et al.* Mechanisms of complement lectin pathway activation and resistance by trypanosomatid parasites. **Molecular Immunology**, v. 53, n. 4, p. 328-334, abr., 2013.

CHAGAS, C. Nova Trypanozomíase Humana. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. p. 160-218, 1909.

CHARGAFF E.; West, R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 166, n. 1, p. 189–197, 1946.

COCUCCI, E.; Racchetti, G.; Meldolesi, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. **Trends Cell Biology**, v. 19, n. 2, p. 43-51, fev., 2009.

COIMBRA, V. C. *et al.* Enucleated L929 cells support invasion, differentiation, and multiplication of *Trypanosoma cruzi* parasites. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 8, p. 3700–3706, ago., 2007.

CONNOR, D. E. *et al.* The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 103, n. 5, p. 1044–1052, mai., 2010.

COURA, J. R. Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 113-117, 2006.

CUEVAS, I. C. *et al.* gp63 homologues in *Trypanosoma cruzi*: surface antigens with metalloprotease activity and a possible role in host cell infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 10, p. 5739-5749, out., 2003.

DE PABLOS, L. M. D.; OSUNA, A. Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity. **Infection and immunity**, v. 80, p. 2258-2264, mar., 2012.

DE SÁ, A. R. *et al.* Cytochrome oxidase subunit 2 gene allows simultaneous detection and typing of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. **Parasites and Vectors**, v. 6, n. 363, dez., 2013.

DEL CONDE, I. *et al.* Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. **Blood**, v. 106, n. 5, p. 1604-1611, set., 2005.

DOLO, V. *et al.* Selective Localization of matrix metalloproteinase 9, b1 integrins, and human lymphocyte antigen class I molecules on membrane vesicles shed by 8701-BC breast carcinoma cells. **Cancer Research**, v. 58, n. 19, p. 4468–4474, out., 1998.

EL-SAYED, N. M. *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, p. 409-415, jul., 2005.

EVANS-OSSES, I.; De Messias-Reason, I.; Ramirez, M. I. The emerging role of complement lectin pathway in trypanosomatids: molecular bases in activation, genetic deficiencies, susceptibility to infection, and complement system-based therapeutics. **The Scientific World Journal**, 2013.

FERNANDES, M. C. *et al.* Extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* are potent inducers of phagocytosis in mammalian cells. **Cell Microbiology**, v. 15, p. 977-991, jun., 2013.

FERREIRA, V. *et al.* The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 5, p. 3042-3050, mar., 2004.

FUJII, T. *et al.* TMEM16F is required for phosphatidylserine exposure and microparticle release in activated mouse platelets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 41, p. 12800-12805, out., 2015.

GALILI, U. The α -gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy. **Immunology and Cell Biology**, v. 83, p. 674–686, 2005.

GARCIA-SILVA, M. R. *et al.* Gene expression changes induced by *Trypanosoma cruzi* shed microvesicles in mammalian host cells: relevance of tRNA-derived halves. **BioMed Research International**, v. 2014, n. 305239, abr., 2014.

GASSER, O.; Schifferli, J. A. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. **Blood**, v. 104, n. 8, p. 2543-2548, out., 2004.

GINESTRA, A. *et al.* The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. **Anticancer Research**, v. 18, n. 5A, p. 3433-3437, 1998.

GONÇALVES, M. F. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. **Experimental Parasitology**, v. 72, n. 1, p. 43-53, jan., 1991.

GONZALEZ, L. J. *et al.* The influence of membrane physical properties on microvesicle release in human erythrocytes. **PMC Biophysics**, v. 2, n. 7, ago., 2009.

GYÖRGY, B. *et al.* Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 16, p. 2667-2688, ago., 2011.

HEIJNEN, H. F. *et al.* Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. **Blood**, v. 94, n. 11, p. 3791-3799, dez., 1999.

JACOBSON, K. C.; Fletcher, R. C.; Kuhn, R. E. Binding of antibody and resistance to lysis of trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunology**, v. 14, n. 1, p. 1-12, jan., 1992.

JIMENEZ, J. J. *et al.* Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. **Thrombosis Research**, v. 109, n. 4, p. 175-180, fev., 2003.

KANADA, M. *et al.* Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 12, p. E1433-1442, mar., 2015.

KULKARNI, M. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi* GP63 proteins undergo stage-specific differential posttranslational modification and are important for host cell infection. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 5, p. 2193-2200, mar., 2009.

LAI, F.; Lichty, W.; Bowdish, D. Microvesicles: ubiquitous contributors to infection and immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 97, fev., 2015.

LAMBRIS, J. D.; Ricklin, D.; Geisbrecht, B. V. Complement evasion by human pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 132-142, fev., 2008.

LEE, B. Y. *et al.* Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 342-348, abr., 2013.

LIMA, F. M. *et al.* The challenge of Chagas' disease: has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells? **New biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 837-843, dez., 2010.

LINDAHL, G.; Sjöbring, U.; Johnsson, E. Human complement regulators: a major target for pathogenic microorganisms. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, p. 44-51, 2000.

LÖTVALL, J. *et al.* Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 26913, 2014.

LUND, M. E. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. **Journal of Immunological Methods**, v. 430, p. 64-70, 2016.

MACKENZIE, A. *et al.* Rapid secretion of Interleukin-1 β by microvesicle shedding. **Immunity**, v. 8, p. 825-835, nov., 2001.

MANTEL, P. Y.; Marti, M. The role of extracellular vesicles in *Plasmodium* and other protozoan parasites. **Cell Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 344-354, mar., 2014.

MARTI, M.; JOHNSON, P. J. Emerging roles for extracellular vesicles in parasitic infections. **Current Opinion in Microbiology**, v. 32, p. 66-70, mai., 2016.

MAYILYAN, K. R. *et al.* Innate Immunity of plants, animals and humans. Holger Heiner. 2008.

MERLE, N. S. *et al.* Complement system part I: molecular mechanisms of activation and regulation. **Frontiers in Immunology**, v. 6, jun., 2015a.

MERLE, N. S. *et al.* Complement system part II: role in immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 6, mai., 2015b.

MILES M. A. *et al.* The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 3, p. 217-225, 1977.

MILLER, M. B.; Bassler, B. L. *Quorum sensing* in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 165-199, 200.

MING, M.; Ewen, M. E.; Pereira, M. E. Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. **Cell**, v. 82, n. 2, p. 287-296, jul., 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Governo Federal. Doença de Chagas. Criado em Março de 2014 Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs/doenca-de-chagas>>, último acesso em 4 de janeiro de 2017.

MORGAN, B. P.; Dankert, J. R., Esser, A. F. Recovery of human neutrophils from complement attack: removal of the membrane attack complex by endocytosis and exocytosis. **The Journal of Immunology**, v. 138, n. 1, p. 246-253, jan., 1987.

MULCAHY, L. A.; Charles Pink. R.; Francisco Carter, D. R. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 24641, ago., 2014.

MURALIDHARAN-CHARI, V. *et al.* Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. **Journal of Cell Science**, v. 123, p. 1603-1611, 2010.

NOGUEIRA, N.; Bianco C.; Cohn, Z. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 142, p. 224-226, jul., 1975.

NOGUEIRA, P. M. *et al.* Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 28734, nov., 2015.

NORRIS, K. A. Stable transfection of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes with the trypomastigote-specific complement regulatory protein cDNA confers complement resistance. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 6, p. 2460-2465, jun., 1998.

PAES, L.S. *et al.* The Uniqueness of the *Trypanosoma cruzi* Mitochondrion: Opportunities to Target New Drugs Against Chagas' Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, p. 2074-2099, 2011.

PAHO, Pan American Health Organization. Chagas disease (American Trypanosomiasis). Atualizado em abril de 2014. Disponível em <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743>, último acesso em 4 de janeiro de 2017.

PAP, E. *et al.* A. Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer. **Inflammation Research**, v. 58, n. 1, p. 1-8, jan., 2009.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. *et al.* Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 1299-1307, mar., 2000.

PILZER, D. *et al.* Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer. **Springer Seminars Immunopathology**, v. 27, n. 3, p. 375-387, nov., 2005.

PLUSKOTA, E. *et al.* Expression, activation, and function of integrin α Mb2 (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. **Blood**, v. 112, n. 6, p. 2327-2335, set., 2008.

RAGONE, P. G. *et al.* Experimental evidence of biological interactions among different isolates of *Trypanosoma cruzi* from the Chaco region. **PLoS One**, v. 10, n. 3, mar., 2015.

RAMIREZ, M. I. *et al.* Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 9, p. 3636-3641, set., 1993.

RAMIREZ, M. I. *et al.* Dynamic flux of microvesicles modulate parasite–host cell interaction of *Trypanosoma cruzi* in eukaryotic cells. **Cellular Microbiology**, set., 2016.

RAPOSO, G.; Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **The Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373–383, fev., 2013.

RASSI, A.; Rassi, A.; Marin-Neto, J.A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, abr., 2010.

RATAJCZAK, J. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. **Leukemia**, v. 20, n. 9, p. 1487-1495, set., 2006.

ROMAN-CAMPOS, D. *et al.* Changes in cellular contractility and cytokines profile during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Basic Research in Cardiology**, v.104, p. 238-246, 2009.

SAHA, B. *et al.* MicroRNA cargo of extracellular vesicles from alcohol-exposed monocytes signals naive monocytes to differentiate into M2 macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 1, p. 149-159, jan., 2016.

SAVINA, A. *et al.* Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. **Traffic**, v. 6, n. 2, p. 131-143, fev., 2005.

SCHENKMAN, S.; Güther, M. L.; Yoshida, N. Mechanism of resistance to lysis by the alternative complement pathway in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes: effect of specific monoclonal antibody. **The Journal of Immunology**, v. 137, n. 5, p. 1623-1628, set., 1986.

SHEDDEN, K. *et al.* Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. **Cancer Research**, v. 63, n. 15, p. 4331-4337, ago., 2003.

SIGMA-ALDRICH. Fundamental techniques in cell culture laboratory handbook: cook book. 2. ed., v. 12, set., 2010.

SILVERMAN, J. M. *et al.* Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. **Genome Biology**, v. 9, n. 2, fev., 2008.

SILVERMAN, J. M. *et al.* Leishmania exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 9, p. 5011-5022, nov., 2010.

SIMONS, K.; Sampaio, J. L. Membrane organization and lipid rafts. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, 2011.

SOUTO, R. P.; ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 62, p. 45- 52, jul., 1993.

STEINDEL, M. *et al.* Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 60, p. 71-80, 1993.

SZEMPRUCH, A. J. *et al.* Extracellular Vesicles from *Trypanosoma brucei* mediate virulence factor transfer and cause host anemia. **Cell**, v. 14, n. 164, p. 246-257, jan., 2016.

TAMBOURGI, D. V. *et al.* A partial cDNA clone of trypomastigote decay-accelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated complement inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 9, p. 3656-3663, set., 1993.

TEIXEIRA, M. M.; Yoshida, N. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by mono-clonal antibodies. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 18, p. 271-282, set., 1986.

TROCOLI-TORRECILHAS, A. C. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 1, p. 29-39, jan., 2009.

TROCOLI-TORRECILHAS, A. C. *et al.* Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan disease. **Microbes and Infection**, v. 14, p. 1465-1474, ago., 2012.

TWU, O. *et al.* *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cells and mediate host-parasite interactions. **PLoS Pathogen**, v. 9, n. 7, jul., 2013.

WALPORT, M. J. Complement. First of two parts. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 14, p. 1058-1066, abr., 2001.

WHO, Chagas Disease (American trypanosomiasis) factsheet nº 340. Atualizado em março de 2016. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>> último acesso em 4 de janeiro de 2017.

WOLF, P. The nature and significance of platelet products in human plasma. **The British Journal of Haematology**, v. 13, n. 3, p. 269-288, 1967.

YÁÑEZ-MÓ, M. *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 27066, 2015.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 1, p. 87-111, 2006.

YOSHIDA, N.; Araguth, M. F. Trypanolytic activity and antibodies to metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* in non-Chagasic human sera. **Parasite Immunology**, v. 9, n. 3, p. 389-393, mai., 1987.

ZHANG, Y. *et al.* Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. **Molecular Cell**, v. 39, p. 133-144, jul., 2010.

ZINGALES, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, nov., 2009.

ZINGALES, B. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 240-253, 2012.

ANEXO A – APROVAÇÃO DE COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DO SORO HUMANO



CEP/HC/UFPR



Curitiba, 02 de agosto de 2007.

Ilmo (a) Sr. (a)
Iara José de Messias Reason
Paola Rosa Luz
Nesta

Prezado Pesquisador:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "MARCADORES DA RESPOSTA IMUNE INATA NA DOENÇA DE CHAGAS" foi analisado e aprovado com pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 31 de julho de 2007. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções 196/96 CNS, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0133.0.208.000-07
REGISTRO CEP/HC: 1457.122/2007-06

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 02 de abril de 2008.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Renato Tambara Filho".

Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clinicas/UFPR

ANEXO B – TRABALHO SUBMETIDO

Microvesicles released during the interaction between *Trypanosoma cruzi* TCI and TCII strains and host blood cells inhibit complement system and increase the infectivity of metacyclic forms to host cell in a strain independent process.

M. P. Wyllie¹ and M. I. Ramirez^{1,2}

¹Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

²Instituto Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Email: marcelr@fiocruz.br

Abstract:

Extracellular vesicles (EVs), whether microvesicles (MVs) or exosomes, shed by pathogens transfer virulence factors and biomolecules to host cells, thereby altering host's susceptibility to infection. We have previously demonstrated that MV releases is increased during the interaction between the infective forms of *Trypanosoma cruzi* and host cells. MVs confer parasite resistance to complement-mediated lysis and enhances parasite invasion. In this study, we show that exist differences at the levels of MVs released in the interaction between metacyclic trypomastigotes of different *T. cruzi* strains (with varied sensitivity to complement-mediated lysis: sensitive G strain TcI and resistant Y strain TcII) and host cells.. MVs produced during the interaction between TcII parasites and host cells increased parasite resistance to complement lysis from 50% to 80% and parasite invasion was increased to over 50%. MVs purified from TcI parasites and host cells interaction have a stronger effect doubling complement resistance and parasite invasion. The complement-mediated lysis essays showed that all Mvs inhibit mainly lectin pathway Interestingly, MVs derived from parasites of one class did not alter complement resistance and the invasion process of parasites from the other class being the first description of MVs from *T. cruzi* with strain – independent phenotypic effect .

Keywords: microvesicles, parasite-host cell interaction, immune evasion, *Trypanosoma cruzi*

Journal:	European Journal of Immunology - 2
Manuscript ID	ej.201746973
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	31-Jan-2017
Complete List of Authors:	Wyllie, Melisa; Universidade Federal do Parana Setor de Ciencias Biologicas, Bioquimica Ramirez, Marcel; instituto oswaldo cruz, laboratorio biologia molecular de parasitas e vetores
Keywords:	extracelular vescicles, Microvesicles, Complement system, Invasion Process, Lectin pathway